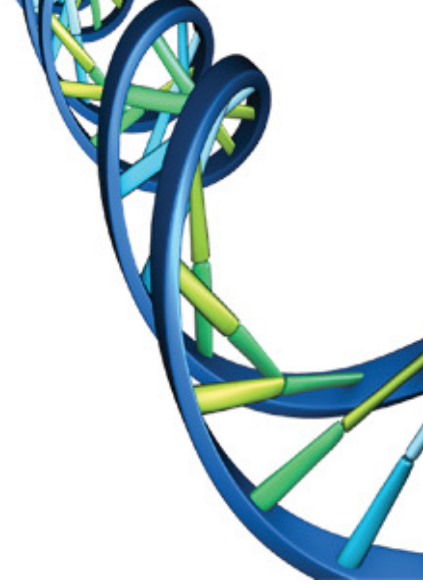


Bedienungsanleitung für das CRC *RAS*Scan™ Combination Kit

Ein SURVEYOR® Scan *KRAS* und *NRAS* Kit Exon 2, 3 & 4 CE IVD

für DHPLC-Systeme

CE IVD

Bitte lesen Sie diese Bedienungsanleitung sorgfältig durch, bevor Sie dieses Produkt verwenden.

Heben Sie diese Bedienungsanleitung auf, vielleicht möchten Sie später etwas nachschlagen.

Transgenomic®
Advancing Personalized Medicine

Diese Seite ist absichtlich leer.

Inhaltsverzeichnis

1 Hersteller 3
2 CRC *RAS*can™ Combination Kit 3
2.1 Verwendungszweck 3
2.2 Angaben zum Gebrauch 3
3 Testprinzip des CRC *RAS*can *KRAS* und *NRAS* Mutation Detection Assay 4
3.1 *KRAS* und *NRAS* 4
3.2 Analyse von Patientenproben mit den SURVEYOR Scan Kits 4
3.3 SURVEYOR Nuclease 5
4 Rückverfolgbarkeit der Kit-Kontrollen 6
5 Komponenten 7
5.1 SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exons 2, 3 & 4 Karton (h 710107) 7
5.2 SURVEYOR Scan *NRAS* Kit Exon 2, 3 & 4 Karton (h 710400) 8
5.3 Anzahl der Proben, die mit dem Kit getestet werden können 8
5.4 DNA-Sequenzierung 9
6 Zusätzlich erforderliche Ausrüstung und Reagenzien 9
7 Reagenzienvorbereitung 9
8 Lagerung und Haltbarkeit 10
9 Warnhinweise & Vorsichtsmaßnahmen 10
10 Primäre Probenentnahme, Handhabung und Lagerung 10
11 Testverfahren 11
11.1 Somatischer Mutationsnachweis mit SURVEYOR Scan Kits - Ein Überblick 11
12 Schritt-für-Schritt-Anleitung 12
12.1 DHPLC **Grund**einstellung/Kalibration 12
12.2 Überlegungen vor Beginn der *KRAS*- und *NRAS*-Probenanalyse 12
12.3 Überlegungen zu den Matrizen 12
12.4 Überlegungen zum Arbeitsablauf 12
12.5 Amplifikationsprotokoll 15
12.6 Thermocycler-Programm für Amplifikationsprotokoll 18
12.7 Qualitätskontrolle der PCR-Produkte 18
12.8 SURVEYOR Nuclease-Verdau 19
13 Kontrollverfahren 20
13.1 Qualitätskontrolle für das CRC *RAS*can Combination Kit 20
13.2 Verwendung von Kontrollplasmid-DNAs 21
14 Interpretation der Ergebnisse 21
14.1 Analyse von *KRAS* und *NRAS* Exons 2, 3 und 4 mit der SURVEYOR Nuclease 21
14.2 Datenprüfung der SURVEYOR Scan-Ergebnisse 22
14.3 Beispielergebnisse 23
15 Leistungsmerkmale 30
15.1 Nachweisgrenze von Mutationen mit SURVEYOR Scan-Kits 30
15.2. Sequenzbestätigung 30
15.3 Verfahrensbeschränkungen 31
Anhang A 32
A.1 Plattenlayout für SURVEYOR Scan-Kits 32
A.2 Kontroll-DNA-Stempel 32
A.3 HPLC (DHPLC) Systemanforderungen für die Denaturierung 33
A.4 Laboreinrichtung für PCR-Tests 35
A.5 Literaturnachweis 36
Anhang B 37
Fehlersuche 37
Einzelheiten zur Bestellung 44
Kontaktdaten 44
Übersetzungseinschränkung 44
Lizenzen, Handelsmarken & Copyright 45

1 Hersteller

Hersteller	M	Transgenomic, Inc. 12325 Emmet Street, Omaha, NE 68164, USA. Tel. +1-402-452-5400.
Vertreter in der EU	P	Transgenomic Limited, 40 Watt Road, Hillington Park, Glasgow G52 4RY, UK. Tel. +44-141-892-8800.

2 CRC *RAS*can™ Combination Kit

2.1 Verwendungszweck

Anwendung nur durch Fachpersonal. Das CRC *RAS*can Combination Kit von Transgenomic ist ein *In-vitro*-Diagnostikum zum Nachweis von somatischen Mutationen in Exons 2, 3 & 4 des *KRAS*- und *NRAS*- Gens. Diese Mutationen werden durch SURVEYOR Nuclease-Spaltpeaks angezeigt und enthalten jene Mutationen mit bekanntem Potenzial für klinische Signifikanz. Dieses Kit ist für den Gebrauch in einem Labor für klinische Diagnostik durch entsprechend ausgebildetes Fachpersonal vorgesehen. Getestet wird DNA, die aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe extrahiert wird.

Dieses Kit hat die Katalognummer 710077. Diese Bedienungsanleitung ist auch als Download erhältlich unter

http://world.transgenomic.com/files/literature/482427-DE.pdf.

2.2 Angaben zum Gebrauch

Mediziner können den CRC *RAS*can Combination Kit für DHPLC-Systeme als Hilfe bei der Entscheidung verwenden, ob Patienten mit kolorektalem Karzinom auf eine Therapie mit Anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor bzw. epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor)-Therapeutika wie Panitumumab ansprechen.

Das CRC *RAS*can Combination Kit **darf nicht** zur Diagnose von kolorektalem Karzinom oder anderen Krebsarten verwendet werden.

Das CRC *RAS*can Combination Kit ist ein Test, der die Anwesenheit potenzieller somatischer Mutationen in Exons 2, 3 & 4 des *KRAS* und *NRAS*-Gens nachweist, aber nicht die Sequenzidentität der Mutation bestätigt. **Um nachzuweisen, um welche Mutation es sich genau handelt, sind weitere Untersuchungen wie zum Beispiel eine DNA-Sequenzierung erforderlich.**

Wenngleich die mit diesen Kits erhaltenen Ergebnisse ein Hinweis auf den Mutationsstatus eines Patienten sind, müssen jedoch weitere klinische Faktoren berücksichtigt werden. Die Ergebnisse mit dem CRC *RAS*can Combination Kit **dürfen nicht als die einzige Methode zur Entscheidungsfindung einer Behandlung von Patienten mit kolorektalem Karzinom herangezogen werden**.

Es ist wichtig, darauf hinzuweisen, dass die DHPLC mit diesem Kit zur Identifikation von Proben mit positivem Testergebnis für eine *KRAS*- oder *NRAS*-Mutation nur als Richtlinie zu verwenden ist und **alle Mutationen durch weitere Analyse, wie zum Beispiel durch eine DNA-Sequenzierung, bestätigt werden müssen.**

3 Testprinzip des CRC *RAS*can *KRAS* und *NRAS* Mutation Detection Assay

3.1 *KRAS* und *NRAS*

Auf den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) gerichtete therapeutische Wirkstoffe haben sich bei kolorektalem Karzinom als wirksam erwiesen. Die Forschung hat gezeigt, dass rund 40% der kolorektalen Tumoren somatische *KRAS*-Genmutationen tragen, und klinische Studien haben bewiesen, dass Mutationen in *KRAS* Exon 2 (Codon 12 und 13) mangelndes klinisches Ansprechen auf Anti-EGFR-Therapien voraussagen. Neueste explorative Studien haben gezeigt, dass die Patientenpopulation weiter differenziert werden kann, da Patienten, deren mCRC-Tumoren eine zusätzliche Mutation in *KRAS* Exon 3 und 4 oder *NRAS* Exon 2, 3 und 4 bergen, ebenfalls dazu neigen, nicht auf eine Therapie mit Anti-EGFR anzusprechen[1-7]. Dieses Kit wurde für den Gebrauch in der diagnostischen Analyse von somatischen Mutationen in *KRAS* und *NRAS* Exons 2, 3 & 4 entwickelt.

Das CRC *RAS*can Combination Kit ist ein Test zum Nachweis aller Sequenz- und kleinen Insertions-/Deletionsveränderungen in Exons 2, 3 & 4 des *KRAS*- und *NRAS*-Gens. Mutationen im *KRAS* und *NRAS* Codon 12, 13, 59, 61, 117 und 146 wurden mit der mangelnden Wirksamkeit von Panitumumab in Verbindung gebracht. Mit diesem Kit werden Positive Controls für Mutationen in Codon 12, 61, 117 und 146 mitgeliefert.

Dieses Kit verwendet die patentrechtlich geschützte Technologie SURVEYOR Nuclease von Transgenomic und bietet in Verbindung mit dem DHPLC System einen einfachen und empfindlichen Nachweis potenzieller Mutationen. Damit kann vor einem Hintergrund aus nicht-mutanter DNA ein Gemisch aus 2–5% mutanter DNA nachgewiesen werden. Untersuchungen zur Validierung haben eine sehr hohe Übereinstimmung mit der Sequenzierung von gut charakterisierten kolorektalen Tumorproben gezeigt. Durch die Verwendung des CRC *RAS*can Combination Kit reduziert sich für den Anwender die Sequenzierungsarbeit und ermöglicht darüber hinaus aggressive Sequenzzuordnung, wo eine automatische Sequenzierungssoftware eine Mutation oft nicht klären kann.

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit hinsichtlich der Sanger-Sequenzierung wird empfohlen, die Laboreinrichtung zu optimieren, um eine Kreuzkontamination von Proben oder Kontrollen zu vermeiden. Ein Beispiel einer idealen Laboreinrichtung finden Sie im ***Anhang A.4 Laboreinrichtung für PCR-Tests***.

3.2 Analyse von Patientenproben mit den SURVEYOR Scan Kits

Das CRC *RAS*can Combination Kit darf nur zusammen mit einem der unten genannten Arbeitsabläufe verwendet werden.

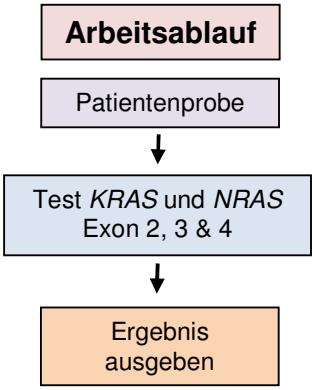


Abb. 1 CRC *RAS*can Combination Kit Arbeitsablauf zum Screening auf *KRAS* und *NRAS*

Als Vorschlag, wie 96-Loch-Mikrotiterplatten für die Analyse von *KRAS* und *NRAS* Exon 2-4 anzulegen sind, siehe ***Anhang A.1 Plattenlayout für das* CRC *RAS*can Combination Kit**.

3.3 SURVEYOR Nuclease

Die SURVEYOR Nuclease von Transgenomic ist eine mismatch-spezifische Pflanzen-DNA-Endonuclease, die die Heteroduplex-DNA auf bekannte und unbekannte Mutationen und Polymorphismen durchsuchen kann[8]. Das Enzym schneidet mit hoher Spezifität einen DNA-Doppelstrang an Stellen, wo durch einen Basenaustausch oder andere Sequenzveränderungen Basen nicht miteinander paaren können. Diese DNA-Nuclease spaltet beide Stränge eines DNA-Heteroduplex am 3'-Ende der Mismatch-Stelle. Insertion-/Deletion-Mismatches und alle Basenaustausch-Mismatches werden erkannt, aber die Spalteffizienz variiert mit der Mismatch-Sequenz.

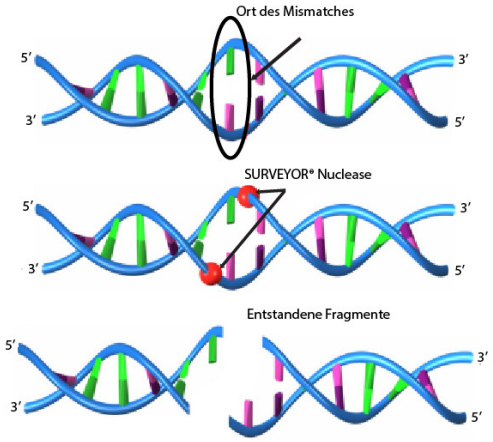


Abbildung 2: Wirkungsweise der SURVEYOR Nuclease Die Endonuclease erkennt ein Mismatch und spaltet am 3'-Ende der Mismatch-Basen. Das spaltet den DNA-Doppelstrang, was einen einzigen 3'-Basenüberhang hinterlässt.

Die SURVEYOR Nuclease wurde in einer ganzen Reihe von Projekten eingesetzt, um in Genen eine Vielzahl von Mutationen und Polymorphismen nachzuweisen. Insbesondere wird die SURVEYOR Nuclease verwendet, um bekannte Mutationen in einer Reihe von Genen zu bestätigen, die mit Nieren-, Lungen-, Kopf- und Halskrebs sowie Leukämie und Endometriumkarzinom in Verbindung gebracht werden. Ebenso wurde das Enzym zur Ergebnisprognose einer Strahlentherapie eingesetzt[9,10,11].

Das CRC *RAS*can Combination Kit wurde zur Spaltung von Mismatches in *KRAS* und *NRAS* Exons 2, 3 & 4 und der anschließenden Analyse mit DHPLC entwickelt.

Anmerkung: Wenn eine Probe 100% mutante DNA ist, können keine Heteroduplices gebildet werden und die Probe erscheint als „Wild-Type". Proben aus Tumorbiopsien enthalten allerdings aufgrund der Tumorheterogenität und/oder kontaminierendem normalen Gewebe Wild-Type-Zellen; bitte beachten Sie, dass Proben mit 5% und 95% mutanter DNA identische Chromatogramm ergeben.

Anmerkung: Für diesen Test ausschließlich die mit diesem Kit mitgelieferte DNA Polymerase verwenden.

Anmerkung: Befolgen Sie bitte die spezifischen Anleitungen im Bedienungshandbuch Ihres DHPLC-Systems.

Um dieses Kit erfolgreich einzusetzen, wird dringend angeraten, diese Bedienungsanleitung sorgfältig durchzulesen und alle darin gegebenen Anleitungen und Richtlinien genau zu befolgen. Personen, die diesen Test zum ersten Mal durchführen, sollten die in Abschnitt *Verwendung der Kontrollplasmid-DNAs* beschriebenen Kontrolluntersuchungen durchführen.

Falls Sie weitere Fragen haben oder Hilfe benötigen, rufen Sie **(888) 233-9283** (nur Nordamerika), **+1 (402) 452-5400** oder **+44 (0) 141 892 8800** (Europa) an und fragen nach dem „*KRAS* und *NRAS* support". Alternativ können Sie eine E-Mail senden an:

SURVEYORscan@Transgenomic.com

4 Rückverfolgbarkeit der Kit-Kontrollen

Die mit diesem Kit mitgelieferten Kontrollen sind Plasmidklone der Sequenzen *KRAS* und *NRAS* Exons 2, 3 & 4. Alle Klone wurden sequenziert, um sie durch Vergleich mit der NCBI Reference Sequences auf Sequenztreue zu überprüfen: NG_007524.1 (*KRAS*) und NG_007572 (*NRAS*).

Die Kontrollen haben einen genetischen „Stempel". Siehe ***Anhang A.2 Kontroll-DNA-Stempel***; dabei handelt es sich um Variationen aus den *KRAS* oder *NRAS* Wild-Type-Sequenzen in einer Region, wo keine Mutationen erwartet werden, die verwendet werden können, um Probleme mit Probenkontamination durch Positive Controls zu erkennen. Siehe ***Anhang B - Fehlersuche***, ***Problem 8***, für ein Beispiel einer SURVEYOR Scan-Spur einer solchen Kontamination.

Der „***KRAS* Control Wild-Type"** wurde durch Synthese und Klonierung von *KRAS* Exons 2, 3 und 4 unter Verwendung von NCBI Reference Sequence NG_007524.1 konstruiert.

Die „***KRAS* Positive Control Exon 2"** wurde durch Synthese von *KRAS* Exon 2 unter Verwendung der NCBI Reference Sequence oben konstruiert, enthält aber die G12D-Mutation. Durch DNA-Sequenzierung wurde bestätigt, dass die einzige Änderung in der Sequenz von Codon 12 in einer G12D, GGT>GAT-Alteration vorliegt. Dieser Klon wird dann mit *KRAS* Control Wild-Type-DNA gemischt, um eine heterozygote Mischung zu erhalten.

Das „***KRAS* Positive Control Exon 3"** wurde durch Synthese von *KRAS* Exon 3 unter Verwendung der NCBI Reference Sequence oben konstruiert, enthält aber die Q61H-Mutation. DNA-Sequenzierung bestätigte, dass die einzige Änderung in der Sequenz von Codon 61 in einer Q61H-Alteration (CAA>CAC) vorliegt. Dieser Klon wird dann mit *KRAS* Control Wild-Type-DNA gemischt, um eine heterozygote Mischung zu erhalten.

Das „***KRAS* Positive Control Exon 4A"** wurde durch Synthese von *KRAS* Exon 4 unter Verwendung der NCBI Reference Sequence oben konstruiert, enthält aber die K117N-Mutation. DNA-Sequenzierung bestätigte, dass die einzige Änderung in der Sequenz von Codon 117 in einer K117N-Alteration (AAA>AAT) vorliegt. Dieser Klon wird dann mit *KRAS* Control Wild-Type-DNA gemischt, um eine heterozygote Mischung zu erhalten.

Das „***KRAS* Positive Control Exon 4B"** wurde durch Synthese von *KRAS* Exon 4 unter Verwendung der NCBI Reference Sequence oben konstruiert, enthält aber die A146T-Mutation. DNA-Sequenzierung bestätigte, dass die einzige Änderung in der Sequenz von Codon 146 in einer A146T-Alteration (GCA>ACA) vorliegt. Dieser Klon wird dann mit *KRAS* Control Wild-Type-DNA gemischt, um eine heterozygote Mischung zu erhalten.

Der „***NRAS* Control Wild-Type"** wurde durch Synthese und Klonierung von *NRAS* Exons 2, 3 und 4 unter Verwendung der NCBI Reference Sequence NG_007572 konstruiert.

Das „***NRAS* Positive Control Exon 2"** wurde durch Synthese von *NRAS* Exon 2 unter Verwendung der NCBI Reference Sequence oben konstruiert, enthält aber die G12D-Mutation. Durch DNA-Sequenzierung wurde bestätigt, dass die einzige Änderung in der Sequenz von Codon 12 in einer G12D, GGT>GAT-Alteration vorliegt. Dieser Klon wird dann mit *NRAS* Control Wild-Type-DNA gemischt, um eine heterozygote Mischung zu erhalten.

Das „***NRAS* Positive Control Exon 3"** wurde durch Synthese von *NRAS* Exon 3 unter Verwendung der NCBI Reference Sequence oben konstruiert, enthält aber die Q61K-Mutation. Durch DNA-Sequenzierung wurde bestätigt, dass die einzige Änderung in der Sequenz von Codon 61 in einer Q61K-Alteration (CAA>AAA) vorliegt. Dieser Klon wird dann mit *NRAS* Control Wild-Type-DNA gemischt, um eine heterozygote Mischung zu erhalten.

Das „***NRAS* Positive Control Exon 4"** wurde durch Synthese von *NRAS* Exon 4 unter Verwendung der NCBI Reference Sequence oben konstruiert, enthält aber die A146T-Mutation. Durch DNA-Sequenzierung wurde bestätigt, dass die einzige Änderung in der Sequenz von Codon 146 in einer A146T-Alteration (GCC>ACC) vorliegt. Dieser Klon wird dann mit *NRAS* Control Wild-Type-DNA gemischt, um eine heterozygote Mischung zu erhalten.

5 Komponenten

Das CRC *RAS*can Combination Kit wird in zwei Kartons in einer Schutzhülle geliefert: (a) ein Karton mit Reagenzien zur Analyse von *KRAS* Exons 2, 3, und 4 und (b) ein Karton mit Reagenzien zur Analyse von *NRAS* Exons 2, 3 und 4. Zusammen sind in den Kartons ausreichend Reagenzien vorhanden, um die wie in Abschnitt 5.3 aufgeführte Anzahl Analysen durchzuführen.

5.1 SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exons 2, 3 & 4 Karton (h 710107)

Der Karton mit den Komponenten zur Analyse von *KRAS* Exons 2, 3 und 4 enthält zwei Schachteln: (1) eine **SURVEYOR Schachtel mit Verdau-Komponenten** mit 10 Reagenzgefäßen und (2) einer äußeren **Halterung für PCR-Komponenten und Kontrollröhrchen** mit 20 Reagenzgefäßen.

Katalog-nummer	Kit-Komponente	Reaktionsgefäß Deckelfarbe	Kit für 130 Testreaktionen, gelieferte Menge
SURVEYOR Schachtel mit Verdau-Komponenten			
710160	SURVEYOR Nuclease W	Violett	3 x 105 µL
710161	SURVEYOR Enhancer W2	Schwarz	2 x 105 µL
708049	SURVEYOR Enhancer Cofactor	Rosa	2 x 105 µL
708027	0.15 M $MgCl_2$ Solution	Braun	2 x 105 µL
708030	Stop Solution	Rot	250 µL
PCR-Box mit Komponenten und Kontrollen			
703310	DNA Polymerase	Durchsichtig	2 x 100 µL
703315	10x DNA Polymerase Reaction Buffer	Durchsichtig	1 mL
703065	dNTPs (10 mM)	Durchsichtig	2 x 500 µL
710155F	*KRAS* Primer: Exon 2 Forward (10 µM)	Blau	125 µL
710155R	*KRAS* Primer: Exon 2 Reverse (10 µM)	Blau	125 µL
710157F	*KRAS* Primer: Exon 3 Forward (10 µM)	Blau	90 µL
710157R	*KRAS* Primer: Exon 3 Reverse (10 µM)	Blau	90 µL
710154F	*KRAS* Primer: Exon 4A Forward (10 µM)	Blau	90 µL
710154R	*KRAS* Primer: Exon 4A Reverse (10 µM)	Blau	90 µL
710156F	*KRAS* Primer: Exon 4B Forward (10 µM)	Blau	90 µL
710156R	*KRAS* Primer: Exon 4B Reverse (10 µM)	Blau	90 µL
710131	*KRAS* Control Wild-Type	Gelb	120 µL
710135	*KRAS* Positive Control Exon 2	Grün	40 µL
710136	*KRAS* Positive Control Exon 3	Grün	40 µL
710137	*KRAS* Positive Control Exon 4A	Grün	40 µL
710138	*KRAS* Positive Control Exon 4B	Grün	40 µL
710153F	Universal Sequencing Primer 1 (10 µM)	Orange	125 µL
710153R	Universal Sequencing Primer 2 (10 µM)	Orange	125 µL

5.2 SURVEYOR Scan *NRAS* Kit Exon 2, 3 & 4 Karton (h 710400)

Der Karton mit den Komponenten zur Analyse von *NRAS* Exon 2, 3 und 4 enthält zwei Schachteln: (1) eine **SURVEYOR Schachtel mit Verdau-Komponenten** mit 10 Reagenzgefäßen ohne leer Löcher und (2) einer äußeren **Halterung für PCR-Komponenten und Kontrollröhrchen** mit 14 Reagenzgefäßen.

Katalog-nummer	Kit-Komponente	Reaktionsgefäß Deckelfarbe	Kit für 100 Testreaktionen, gelieferte Menge
SURVEYOR Schachtel mit Verdau-Komponenten			
710160	SURVEYOR Nuclease W	Violett	2 x 105 µL
710161	SURVEYOR Enhancer W2	Schwarz	105 µL
708049	SURVEYOR Enhancer Cofactor	Rosa	105 µL
708027	0.15 M $MgCl_2$ Solution	Braun	105 µL
708030	SURVEYOR Stop Solution	Rot	250 µL
710153F	Universal Sequencing Primer 1 (10 µM)	Orange	2 x 125 µL
710153R	Universal Sequencing Primer 2 (10 µM)	Orange	2 x 125 µL
PCR-Box mit Komponenten und Kontrollen			
703310	DNA Polymerase (250 U)	Rot	100 µL
703312	DNA Polymerase (50 U)	Rot	20 µL
703315	DNA Polymerase 10X PCR Buffer	Durchsichtig	1 mL
703065	dNTPs (10 mM)	Durchsichtig	500 µL
710452F	*NRAS* Primer Exon 2 Forward (10 µM)	Blau	90 µL
710452R	*NRAS* Primer Exon 2 Reverse (10 µM)	Blau	90 µL
710453F	*NRAS* Primer Exon 3 Forward (10 µM)	Blau	90 µL
710453R	*NRAS* Primer Exon 3 Reverse (10 µM)	Blau	90 µL
710454F	*NRAS* Primer Exon 4 Forward (10 µM)	Blau	90 µL
710454R	*NRAS* Primer Exon 4 Reverse (10 µM)	Blau	90 µL
710441	*NRAS* Control Wild-Type Mix	Gelb	120 µL
710442	*NRAS* Positive Control Exon 2	Grün	40 µL
710443	*NRAS* Positive Control Exon 3	Grün	40 µL
710444	*NRAS* Positive Control Exon 4	Grün	40 µL

5.3 Anzahl der Proben, die mit dem Kit getestet werden können

Das CRC *RAS*can Combination Kit ist für 230 Reaktionen vorgesehen. Die Gesamtprobenanzahl hängt von der Größe der jeweiligen durchschnittlichen Seriengrößen der zu testenden Proben ab, da mit jeder Probenserie jeweils ein Satz Kontrollreaktionen (Wild-Type Controls, Positive Controls und No Template Controls) auf jeder Mikrotiterplatte mitgeführt werden muss. In der nachstehenden Tabelle ist die Anzahl Proben aufgeführt, die mit dem *KRAS*- und *NRAS*-Kit je nach durchschnittlicher Größe der Probenserie getestet werden können. Die Berechnung beruht auf der Basis, dass (a) jede Serie 21 Kontrollen (7x Control Wild-Type, 7x Positive Control, 7x No Template Control) benötigt, und (b) jedes Kit für 230 Reaktionen ausgelegt ist.

Anmerkung: Wenn mehrere Platten laufen sollen, muss auf jeder einzelnen Platte ein Satz der 21 oben angegebenen Kontrollen mitgeführt werden. Daher benötigen zwei Platten insgesamt 42 Kontrollreaktionen, 3 Platten benötigen 63 Kontrollreaktionen, usw.

Mit Ansteigen der Größe der Probenserie erhöht sich auch die Anzahl der Proben, die insgesamt mit einem Kit getestet werden können, wodurch sich die Reagenzienkosten je Probe im Durchschnitt reduzieren. Die Tabelle unten dient als Orientierung dafür, wie viel Proben mit dem Kit getestet werden können.

Größe der Proben-serie	Anz. Kontrollreaktionen + Anz. Probenamplikons	Anz. erforderl. Reaktionen pro Lauf	Gesamt-anz. Proben-serienläufe pro Kit	Gesamtanz. getesteter Proben pro Kit
1	21 + 7	28	8	8
2	21 + 14	35	6	12
3	21 + 21	42	5	15
4	21 + 28	49	4	16
5	21 + 35	56	4	20

5.4 DNA-Sequenzierung

Sequencing Primer (PNs 710153F und 710153R) werden für die DNA-Sequenzierung aller getesteten Proben geliefert. Die vor dem SURVEYOR Nuclease-Verdau erzeugten PCR-Amplikons sollten für die Sequenzierung verwendet werden.

6 Zusätzlich erforderliche Ausrüstung und Reagenzien

Folgende Komponenten bzw. Ausrüstungen sind für die Verwendung des CRC *RAS*can Combination Kit mit DHPLC zusätzlich erforderlich:

DHPLC-System, Säulen, Puffer, DNA-Größenstandard
- siehe ***Anhang A.3.1 DHPLC Spezifikationen für SURVEYOR Scan Anwendungen*** für Merkmale eines geeigneten DHPLC-Systems zur Verwendung mit diesem Kit

Hochreines Wasser für die Molekularbiologie

0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße, Streifen oder 96-Loch-Mikrotiterplatte

Mikropipetten

Pipettenspitzen

Eisbad

Vortexer

Mikrozentrifuge

Thermocycler

Agarosegele und Ausrüstung für Agarosegel-Elektrophorese

10% Bleiche oder ähnliches Reinigungsmittel

7 Reagenzienvorbereitung

Alle Reagenzien dieses Kits sind gebrauchsfertig. Einige Komponenten müssen vor Gebrauch aufgetaut, mit dem Vortexer gemischt oder in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert werden. Einzelheiten siehe weiter unten unter ***Testverfahren***. Reagenzien müssen zur Herstellung von Master-Mix und Reaktionsgemischen gemischt werden. Eine genaue Anleitung finden Sie im Abschnitt ***Testverfahren***.

8 Lagerung und Haltbarkeit

Das Kit muss bis zu seinem Gebrauch zwischen -18 °C und -25 °C in einem Gefrierschrank mit konstanter Temperatur aufbewahrt werden. Achten Sie bei jedem erhaltenen Kit auf das Verfallsdatum. Das Kit nicht mehr verwenden, wenn das Verfallsdatum überschritten ist.

Das in Schritt 7 des **SURVEYOR Nuclease-Verdaus** vorbereitete SURVEYOR Nuclease-Reaktionsgemisch muss **sofort** verwendet werden, da die Anwesenheit anderer Komponenten im SURVEYOR Nuclease-Reaktionsgemisch die SURVEYOR Nuclease W mit der Zeit inaktiviert.

9 Warnhinweise & Vorsichtsmaßnahmen

Keines der Reagenzien in diesem Kit stellt in den gelieferten Mengen eine Gesundheitsgefährdung dar. Die Dokumentnummer MSD-710077 von Transgenomic kann heruntergeladen werden unter

http://world.transgenomic.com/files/literature/710077-DE.pdf

Dieses Kit enthält keine Substanzen tierischen oder menschlichen Ursprungs, die ein Infektionsrisiko darstellen können.

Dieses Kit darf nur von Personen verwendet werden, die in den entsprechenden Labortechniken ausgebildet wurden. Beim Arbeiten mit den Kitkomponenten immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und Augenschutz tragen. Nach dem Gebrauch müssen die Kitkomponenten als klinischer Abfall und gemäß der für sie anwendbaren Gesetze und Verordnungen entsorgt werden.

Aus den Gefäßen pipettierte Reagenzienaliquots dieses Kits sind nur zum einmaligen Gebrauch bestimmt. Es konnte validiert werden, dass Kitkomponenten auch nach 25 Auftau-/Einfrierzyklen noch stabil sind. Verwenden Sie das Kit nicht, wenn diese Anzahl Zyklen überschritten wurde.

10 Primäre Probenentnahme, Handhabung und Lagerung

Das CRC *RAS*can Combination Kit benötigt DNA, die aus formalinfixierten, paraffineingebetteten (FFPE) kolorektalen Tumorproben extrahiert wurde. Für eine optimale DNA-Extraktion muss das Gewebe 14–24 Stunden in Formalin fixiert werden.

Tumorbiopsien sind eine heterogene Mischung aus Tumorzellen und Nicht-Tumorzellen. Außerdem ist der Tumor an sich eine heterogene Mischung aus Tumorzellen **mit** Mutationen und Tumorzellen **ohne** Mutationen. Da diese somatischen Mutationen möglicherweise nicht gleichmäßig im Tumor verteilt sind, kann die aus verschiedenen Bereichen desselben Tumors resultierende Mutationsanalyse unterschiedlich ausfallen. Um die Wahrscheinlichkeit für einen Mutationsnachweis zu erhöhen, sollte die DNA aus der Tumorregion des Gewebes isoliert werden, indem nur der Tumorbereich von dem Glasobjektträger abgeschabt wird. Dazu für jeden neuen Objektträger ein frisches, steriles Skalpell verwenden.

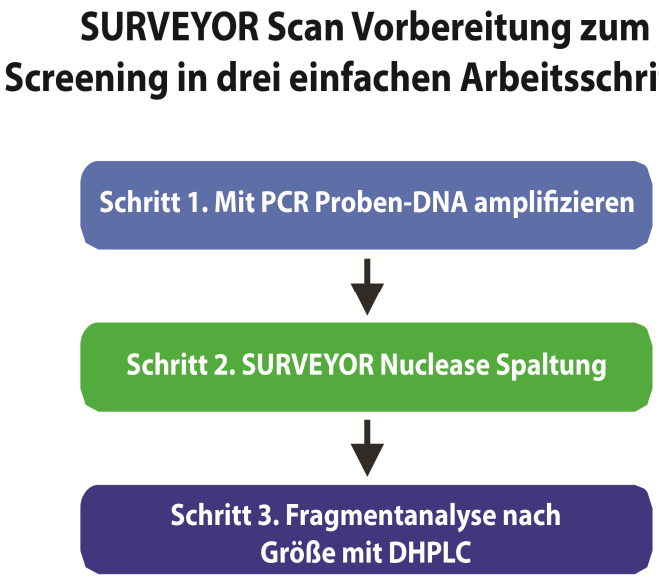
Für eine erfolgreiche Verwendung dieses Kits sollte die entnommene DNA den Kriterien entsprechen, die in den ***Überlegungen zu den Matrizen*** aufgelistet sind.

ANMERKUNG: Entnommene DNA-Proben, die mit diesem Kit nicht sofort analysiert werden, müssen bei -20 °C bis -80 °C eingefroren aufbewahrt werden.

11 Testverfahren

11.1 Somatischer Mutationsnachweis mit SURVEYOR Scan Kits - Ein Überblick

Nachweis und Bestätigung einer Mutation mit der SURVEYOR Nuclease umfasst drei Schritte:


SURVEYOR Scan Vorbereitung zum
Screening in drei einfachen Arbeitsschritten
Schritt 1. Mit PCR Proben-DNA amplifizieren
Schritt 2. SURVEYOR Nuclease Spaltung
Schritt 3. Fragmentanalyse nach
Größe mit DHPLC

Schritt 1 – Vorbereiten der PCR-Amplikons aus mutanter (Test) und normaler (Referenz) DNA. Anschließend an den letzten PCR-Amplifikationszyklus wird zum Schmelzen sämtlicher Doppelstränge das PCR-Produkt erhitzt und dann zur optimalen Bildung von Hetero- und Homoduplices langsam abgekühlt (Heteroduplices kommen vor, wenn ein Strang einer Wild-Type-Sequenz mit einem Strang einer mutanten Sequenz abkühlt).

Schritt 2 – Behandlung des hybridisierten Heteroduplex-Homoduplex-Gemischs mit SURVEYOR Nuclease. SURVEYOR Nuclease schneidet beide Stränge der Heteroduplex-DNA und lässt DNA-Fragmente entstehen. Die gleich behandelte Control Wild-Type-DNA dient als Hintergrundkontrolle.

Schritt 3 – Analyse der DNA-Fragmente mit dem DHPLC-System. Die Bildung neuer Spaltprodukte aufgrund von einem (bzw. mehreren) Mismatch wird durch zusätzliche chromatografische Peaks angezeigt. Die Retentionszeit der Spaltprodukte weist auf die Größe der Fragmente und daher den ungefähren Ort des/der Mismatches hin.

12 Schritt-für-Schritt-Anleitung

12.1 DHPLC Grundeinstellung/Kalibration

Bei der Vorbereitung der SURVEYOR Nuclease-Platte zur Analyse mit DHPLC schlagen Sie bitte nach im ***Anhang A.3 HPLC (DHPLC) Systemanforderungen für die Denaturierung.***

12.2 Überlegungen vor Beginn der *KRAS*- und *NRAS*-Probenanalyse

Bevor Sie Proben auf einem DHPLC-System laufen lassen, muss ein geeigneter DNA-Größenstandard getestet werden, um zu gewährleisten, dass das System einwandfrei funktioniert. Das Laborpersonal, das mit dem Instrument arbeitet, sollte vor Durchführung der Analyse die Qualität des DNA-Größenstandards prüfen.

12.3 Überlegungen zu den Matrizen

1. Verwenden Sie für die FFPE-isolierte Matrizen-DNA die üblichen Labortechniken, um die Qualität und Quantität der extrahierten DNA zu bewerten, und um zu gewährleisten, dass für die PCR ausreichend Matrize vorhanden ist.
2. Das 260:280 Absorptionsverhältnis muss größer als 1,80 sein.
3. Um das PCR-Setup zu beschleunigen, stellen Sie die Gebrauchskonzentration der Matrize auf ungefähr 12,5 ng/µL ein. Verdünnen Sie bei Bedarf die Matrizen-DNA mit hoch reinem Wasser für die Molekularbiologie.

12.4 Überlegungen zum Arbeitsablauf

Das Kit ist für die Analyse von 230 Reaktionen ausgelegt. Kleinere Probenserien können ausgeführt werden, aber die Kit-Kontrolle und eine „No Template Control" müssen bei jeder Probenserie mitgeführt werden. Im Kit ist ausreichend Kontrollmaterial für 230 Reaktionen aller Kombinationen der zu verwendenden Probenseriengrößen.

Im Allgemeinen sollte die Probenverarbeitung von Anfang bis Ende so ausgeführt werden, wie in dieser Bedienungsanleitung beschrieben. Wenn die Verarbeitung einer Probe vor der Fertigstellung aller Schritte unterbrochen werden muss, sollte die DNA bei angegebener Stelle bei -20 °C gelagert werden. Allerdings sollten gefrorene Proben nicht wiederholten Einfrier-/Auftauzyklen ausgesetzt werden, und die Tiefkühllagerung (-18 bis -25 °C) von PCR-amplifizierter DNA bzw. SURVEYOR Nuclease-Verdauprodukten über einen Zeitraum (>1 Woche) sollte vermieden werden.

Die Probenanalyse sollte dem unten aufgeführten Arbeitsablauf folgen:

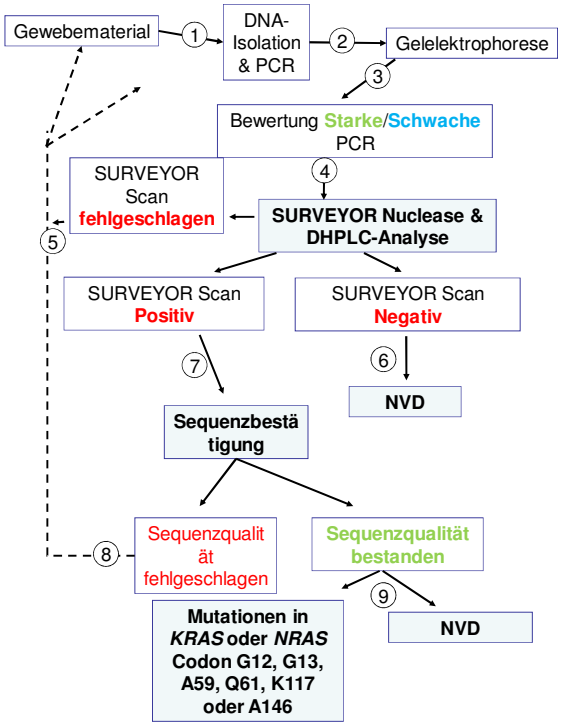


Abbildung 3 Arbeitsablauf der Analyse mit dem CRC *RAS*can Combination Kit

Anmerkungen zu Abbildung 3

1. Isolieren Sie mit den Standardlabortechniken die DNA aus FFPE.
2. Führen Sie die PCR durch und prüfen Sie die DNA-Qualität durch Gelelektrophorese.
3. Dokumentieren Sie, ob die Bande **stark** (≥20 ng) oder **schwach** (<20 ng) ist.

Wenn mehrere PCR-Banden vorliegen, bereiten Sie aus FFPE frische genomische DNA vor.

4. Bei Proben, die nach der PCR-Amplifizierung als **starke PCR** bzw. **schwache PCR** bewertet wurden, kann die Behandlung mit SURVEYOR Nuclease und Analyse mit dem DHPLC-System angeschlossen werden.

   Beachten Sie, dass mit einer schwachen PCR-Zuordnung unzureichende DNA für das Erzielen aussagefähiger Ergebnisse mit DHPLC, aber genug DNA für die Sequenzierung vorhanden sein kann.

5. Siehe ***Anhang B – Fehlersuche*** für Beispiele fehlgeschlagener SURVEYOR Scan-Ergebnisse. Alle Proben mit dem Ergebnis SURVEYOR Scan fehlgeschlagen sollten noch einmal neu bearbeitet werden:
   a. Wenn noch ausreichend genomische DNA vorhanden ist, die PCR wiederholen.
   b. Aus FFPE erneut DNA extrahieren; dies muss die zweite Wahl sein, da es normalerweise nicht wünschenswert ist, einen FFPE–Block nachzuschneiden.
   c. Wenn ein anderer Gewebeschnitt oder -Block verwendet wird, muss der gesamte Test wiederholt werden, da es aufgrund der Tumorheterogenität zu Abweichungen im Verdau kommen kann.
6. Wenn keine Spalt-Peaks sichtbar sind, für den SURVEYOR Scan ein negatives Ergebnis angeben, d. h. NVD = No Variant Detected (keine Variante nachgewiesen).
7. Wenn eine Probe SURVEYOR Nuclease-Spaltprodukte anzeigt (entspricht nicht der jeweiligen Wild-Type Control), sollte sie zur Sequenzbestätigung gesandt werden.
8. Wenn die Sequenzbestätigung nicht annehmbar ist, dann:
   a. Wenn noch ausreichend genomische DNA vorhanden ist, die PCR wiederholen.
   b. Aus FFPE erneut DNA extrahieren; dies muss die zweite Wahl sein, da es normalerweise nicht wünschenswert ist, einen FFPE–Block nachzuschneiden.
9. Bei einer akzeptablen Bestätigungsanalyse sollte eines der folgenden Resultate zutreffen:
   a. Wild-Type-Sequenz, das heißt No Variant Detected (NVD, keine Variante nachgewiesen), oder
   b. Variant Detected (Variante nachgewiesen). Wenn die Sequenzbestätigung eine Änderung der Basensequenz anzeigt, die zu einer Veränderung einer Aminosäure führt bei:
      i. Codon 12 oder 13
      ii. Codon 59 oder 61
      iii. Codon 117 oder
      iv. Codon 146

   ist dies als *KRAS*- oder *NRAS*-Mutation positiv zu bewerten.

Anmerkung: Es ist möglich, eine positive SURVEYOR Scan-Zuordnung zu haben, der bei der Sequenzbestätigung zudem in ein „No Variant Detected" (keine Variante festgestellt) resultiert. Die Nachweisgrenze (Level of Detection, LoD) der SURVEYOR Nuclease auf einem DHPLC-System ist für einige Mutationen so gering wie 2% Mutant in 98%Wild-Type-DNA, wohingegen die LoD der Sequenzierung circa 10-25% Mutant in 90-75% Wild-Type-DNA beträgt.

Anmerkung: Wenn eine Probe 100% mutante DNA ist, können keine Heteroduplices gebildet werden und die Probe erscheint als „Wild-Type". Proben aus Tumorbiopsien enthalten allerdings aufgrund der Tumorheterogenität und/oder kontaminierendem normalen Gewebe Wild-Type-Zellen.

Anmerkung: Proben mit 5% und 95% mutanter DNA ergeben identische Chromatogramm.

Anmerkung: Positive SURVEYOR Scan-Ergebnisse können sich aufgrund von Veränderungen in der Basensequenz von denen unterscheiden, die *KRAS*-oder *NRAS*-aktivierend sind. Obwohl diese Mutationen selten sind, ist eine Bestätigung durch eine andere Methode (z. B. DNA-Sequenzierung) erforderlich, um festzustellen, ob ein positives SURVEYOR Scan-Ergebnis tatsächlich eine *KRAS*- oder *NRAS*-aktivierende Mutation ist.

Anmerkung: Das Formalinfixierungsverfahren, das für die Vorbereitung von FFPE-Tumorbiopsieproben verwendet wird, kann zu einer Cytosin-Desaminierung führen. Diese Desaminierung wandelt Cytosin in Uracil um. Die Polymerase „liest“ dieses Uracil als ein Thymin und bindet ein Adenin in die duplizierten Stränge ein. Dies scheint dann eine Mutation zu sein, bei der das normale G jetzt durch ein A ersetzt wird und eine GC- zu AT-Mutation verursacht, die eine Artefaktmutation durch den Fixierungsprozess und keine echte somatische Mutation ist. Diese Vorfälle sind selten, wenn sie jedoch für im PCR-Cycling dupliziert werden, sehen sie wie Mutationen aus. Sie reagieren nicht auf eine erneute Analyse.

Beispiele für mögliche Cytosin-Desaminierungsmutationen, die für eine Bestimmung der Patiententherapie herangezogen würden, sind für *KRAS*:

- Codon 12: AGT (G12S) und GAT (G12D)
- Codon 13: AGC (G13S), GAC (G13D) und GGT (G13G, eine stille Mutation)
- Codon 146: GCA>ACA (A146T)

Beispiele für mögliche Cytosin-Desaminierungsmutationen, die für eine Bestimmung der Patiententherapie herangezogen würden, sind für *NRAS*:

- Codon 12: GGT> AGT (G12S) oder GAT (G12D)
- Codon 13: GGT> AGT (G13S), GAT (G13D) oder GGC (G13G, eine stille Mutation)
- Codon 146: GCC>ACC (A146T)

Daher wird empfohlen, dass alle diese Mutationen durch Doppelanalyse für dieselbe genomische DNA bestätigt oder alle Proben ab Analysebeginn im Doppelansatz durchgeführt werden.

12.5 Amplifikationsprotokoll

1. Die vorgemischte dNTP-Lösungen (PNs 703065 und 705020) von Transgenomic werden in einer Gebrauchskonzentration von 10 mM Gesamtdeoxynucleotid (je 2,5 mM der vier Deoxynucleotiden) geliefert.
2. Die *KRAS* und *NRAS* Forward und Reverse PCR-Primer (*KRAS* PNs 710155F/R, 710157F/R, 710154F/R und 710156F/R; *NRAS* PNs 710452F/R, 710453F/R und 710454F/R) werden als 10 µM geliefert.
3. Nehmen Sie die 10-µM-Primer, 10-mM-dNTPs und den DNA Polymerase 10X PCR Buffer (PN 703315) aus dem Gefrierschrank und lassen sie auf Eis auftauen.
4. Nach dem Auftauen: Vortexen Sie alle Kitkomponenten (~10 Sekunden), um sie gut zu mischen, zentrifugieren Sie diese kurz an (~10 Sekunden), um zu gewährleisten, dass keine Flüssigkeit auf den Behälterdeckeln bleibt, und legen Sie sie auf Eis.
5. Bereiten Sie auf Eis die jeweiligen Master-Mix vor.
6. Halten Sie sich bei der Herstellung eines Master Mix für **jede** der *KRAS* Exon 2, *KRAS* Exon 3, *KRAS* Exon 4A, *KRAS* Exon 4B-Reaktionen, *NRAS* Exon 2, *NRAS* Exon 3 und *NRAS* Exon 4-Reaktionen als Anhaltspunkt an die nachstehende Tabelle:

Anzahl der Reaktionen (7 Proben + 3 Kontrollen):	**10**
Volumenberechnung:	
Volumen Wasser (µL)	**330****
DNA Polymerase 10X PCR Buffer (µL)	50
dNTPs (µL)	40
Forward Primer (µL)	25
Reverse Primer (µL)	25
DNA Polymerase (µL)	10
Master-Mix-Gesamtvolumen	**48,0**

****Anmerkung: Der Anwender sollte auf ein Minimum von 25 ng DNA je 50 µL PCR-Reaktion abzielen.** Erhöhen Sie für extrahierte DNA-Konzentrationen mit weniger als 12,5 ng/µL proportional das Volumen extrahierter DNA, um je Reaktion 25 ng zu erhalten. Reduzieren Sie auch um dieselbe Menge den Wasseranteil in dem jeweiligen Master-Mix, um je Reaktion 50 µL zu erhalten. **Alle mit diesen Master-Mix vorbereiteten Proben brauchen extrahierte DNA, die auf annähernd dasselbe niedrigste Konzentrationsniveau verdünnt wurde**. Es ist nicht empfehlenswert, Konzentrationen extrahierter DNA mit weniger als 5 ng/µL einzusetzen.

7. Berechnen Sie die erforderlichen Volumina für alle Master-Mix-Lösungen anhand der Tabelle oben. Beachten Sie dabei Folgendes:
   (a) **Für Master Mix 1, *KRAS* Exon 2,** sind drei zusätzliche Reaktionen je Probenplatte erforderlich: *KRAS* Control Wild-Type, *KRAS* Positive Control Exon 2 und die *KRAS* Exon 2 No Template Control (NTC1).
   (b) **Für Master Mix 2, *KRAS* Exon 3,** sind drei zusätzliche Reaktionen je Probenplatte erforderlich: *KRAS* Control Wild-Type, *KRAS* Positive Control Exon 3 und die *KRAS* Exon 3 No Template Control (NTC2).
   (c) **Für Master Mix 3, *KRAS* Exon 4A** sind drei zusätzliche Reaktionen je Probenplatte erforderlich: *KRAS* Control Wild-Type, die *KRAS* Positive Control Exon 4A und die *KRAS* Exon 4A No Template Control (NTC3).
   (d) **Für Master Mix 4, *KRAS* Exon 4B** sind drei zusätzliche Reaktionen je Probenplatte erforderlich: *KRAS* Control Wild-Type, die *KRAS* Positive Control Exon 4B und die *KRAS* Exon 4B No Template Control (NTC4).
   (e) **Für Master Mix 5, *NRAS* Exon 2** sind drei zusätzliche Reaktionen je Probenplatte erforderlich für die *NRAS* Control Wild-Type, *NRAS* Positive Control Exon 2 und die *NRAS* Exon 2 No Template Control (NTC5).
   (f) **Für Master Mix 6, *NRAS* Exon 3** sind drei zusätzliche Reaktionen je Probenplatte erforderlich für die *NRAS* Control Wild-Type, die *NRAS* Positive Control Exon 3 und die *NRAS* Exon 3 No Template Control (NTC6).
   (g) **Für Master Mix 7, *NRAS* Exon 4** sind drei zusätzliche Reaktionen je Probenplatte erforderlich für die *NRAS* Control Wild-Type, die *NRAS* Positive Control Exon 4 und die *NRAS* Exon 4 No Template Control (NTC7).

   Anmerkung: Berücksichtigen Sie, dass etwas mehr Master-Mix als in dieser Berechnung angegeben benötigt wird, um Verluste während des Pipettierens auszugleichen.
8. Beschriften Sie 0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße oder die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit den erforderlichen Probeninformationen.
9. Beschriften Sie 2,0-mL-Zentrifugenröhrchen für den jeweiligen vorbereiteten Master-Mix.
10. Fügen Sie diesen 2,0-mL-Zentrifugenröhrchen mit der Beschriftung „Master-Mix“ das erforderliche Volumen an hoch reinem Wasser für die Molekularbiologie hinzu.

11. Fügen Sie den Master-Mix-Röhrchen die erforderliche Menge DNA Polymerase 10X PCR Buffer hinzu.
12. Fügen Sie den Master-Mix-Röhrchen das erforderliche Volumen an 10 mM dNTPs hinzu.
13. Fügen Sie den jeweiligen Master-Mix-Röhrchen das erforderliche Volumen des *KRAS* oder *NRAS* Forward Primer hinzu.
14. Fügen Sie den jeweiligen Master-Mix-Röhrchen das erforderliche Volumen des *KRAS* oder *NRAS* Reverse Primer hinzu.
15. Nehmen Sie die DNA Polymerase (PN 703310) aus dem Gefrierschrank.
16. Zentrifugieren Sie die DNA Polymerase für ~10 Sekunden.
17. Mischen Sie die DNA Polymerase für ~10 Sekunden mit dem Vortexer.
18. Fügen Sie den Master-Mix-Röhrchen das erforderliche Volumen DNA Polymerase hinzu.
19. Verschließen Sie die Master-Mix-Zentrifugenröhrchen.
20. Mischen Sie vor Gebrauch die Zentrifugenröhrchen mit dem Master-Mix mit dem Vortexer (~30 Sekunden) und zentrifugieren sie dann kurz an (~10 Sekunden).
21. Lagern Sie diese bis zum Gebrauch auf Eis.
22. Pipettieren Sie 48,0 µL (siehe Anmerkung oben in Schritt 6) Master-Mix in die entsprechenden Vertiefungen. Wechseln Sie bei Verwendung einer Einkanalpipette jedes Mal die Spitze. Wenn Sie eine Dispenserpipette verwenden, achten Sie darauf, dass von Vertiefung zu Vertiefung nichts verspritzt wird. Halten Sie die Platte auf Eis.
23. Fügen Sie in die entsprechenden Vertiefungen 2,0 µL (siehe Anmerkung oben in Schritt 6) der Probenmatrizen-DNAs oder Wasser (No Template Control, NTC) hinzu. Verwenden Sie neue Pipettenspitzen für jede Probe und vermeiden Sie die Kreuzkontamination durch Verspritzen. Verschließen Sie die Vertiefungen mit den Proben-DNAs und dem NTC mit dem 8-Verschlussstreifen (bei Verwendung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte) bzw. die 0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße mit ihren Deckeln. Vergewissern Sie sich, dass die Deckel fest verschlossen sind.
24. Öffnen Sie erst jetzt die Röhrchen mit den Kontrollmatrizen-DNAs (PNs 710131, 710135, 710136, 710137, 710138, 710441, 710442, 710443 & 710444) – und zwar eines nach dem anderen. Pipettieren Sie diese Kontrollmatrizen zuletzt, um das Risiko einer Kontamination der Proben-DNA zu verringern. Verschließen Sie jede Vertiefung wieder mit den 8-Verschluss-Streifen (wenn Sie eine 96-Loch-Mikrotiterplatte verwenden) bzw. schließen die 0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße mit dem Deckel. Vergewissern Sie sich, dass die Deckel fest verschlossen sind.

    ANMERKUNG: Zur guten Laborpraxis gehört, die No Template Controls (NTC) in Vertiefungen zu geben, die nicht an Positive Controls oder Proben angrenzen.

    ANMERKUNG: Als Vorschlag, wie 96-Loch-Mikrotiterplatte für die Analyse von *KRAS* und *NRAS* Exons 2-4 anzulegen ist, siehe ***Anhang A.1 Plattenlayout für SURVEYOR Scan Kits***.
25. Vortexen Sie (~1/2 Geschwindigkeit) 10 Sekunden lang.
26. Zentrifugieren Sie 1-2 Minuten lang, um zu garantieren, dass alle Lösungen auf dem Boden der Vertiefung oder der Röhrchen gesammelt werden. Vergewissern Sie sich, dass alle Lösungen auf dem Boden jeder Vertiefung bzw. jeden Reaktionsgefäßes sind. Wenn dies nicht der Fall ist, wiederholen Sie die Zentrifugation.

12.6 Thermocycler-Programm für Amplifikationsprotokoll

1. Verwenden Sie folgendes Thermocycler-Protokoll für die PCR-Amplifikation und Heteroduplex-Bildung:

Initiale Denaturierung		
	95 °C	5 Minuten
Touchdown-Amplifikation		
15 Zyklen	95 °C	30 Sekunden
	62 °C, -0,5 ºC/Zyklus	30 Sekunden
	72 °C	25 Sekunden
Amplifikation		
30 Zyklen	95 °C	30 Sekunden
	55 °C	30 Sekunden
	72 °C	25 Sekunden
Finale Extension		
1 Zyklus	72 °C	2 Minuten
Heteroduplex-Bildung		
	95 ºC	2 Minuten
	≤12 °C	Hold

12.7 Qualitätskontrolle der PCR-Produkte

1. Bevor Sie mit dem SURVEYOR Nuclease-Verdau fortfahren, müssen Qualität und Quantität des Amplikons durch Gelelektrophorese (oder äquivalente Mittel) geprüft werden.
2. Analysieren Sie ein Aliquot des PCR-Produkts zusammen mit mehreren verschiedenen Mengen einer 100-bp DNA-Basenpaarleiter.
3. Verwenden Sie die Basenpaarleiter, um die Konzentration amplifizierter DNA zu berechnen.
4. Es sollte nur eine einzige, dem Haupt-PCR-Produkt entsprechende Bande größer als 20 ng/µL verzeichnet werden.
5. Falls mehrere Bande vorhanden sind, vergewissern Sie sich, dass die Qualität der Eingangsmatrizen-DNA ausreichend war (siehe ***Anhang B – Fehlersuche***).
6. Falls kein Produkt zu sehen ist, vergewissern Sie sich, dass die Qualität der Eingangsmatrizen-DNA ausreichend war (siehe ***Anhang B – Fehlersuche***). Wenn die Qualität den Spezifikationen entspricht, erhöhen Sie das Volumen der Matrize auf 4,0 µL je 50 µL Reaktion (Verhältnis von Wasser zu Reaktion auf 31,0 µL reduzieren).
7. In der No Template Control dürfen keine PCR-Produkte zu sehen sein. Wenn bei dieser Kontrolle DNA-Produkte nachweisbar sind, liegt wahrscheinlich eine Kontamination vor, siehe ***Anhang B – Fehlersuche.***
8. Bewerten Sie die PCR als „starke“ PCR oder „schwache“ PCR.
    a. Eine „starke“ PCR muss eine Einzelbande haben, die gleich oder größer als 20 ng/µL ist.
    b. Eine „schwache“ PCR muss eine Einzelbande haben, die kleiner als 20 ng/µL ist.
    c. Führen Sie den SURVEYOR Nuclease-Verdau sowohl mit „starken" als auch „schwachen" PCR-Ergebnissen durch.

TIPP: In dieser Phase können PCR-Produkte bei unter bzw. gleich -20 ºC bis zu einer Woche gelagert werden.

12.8 SURVEYOR Nuclease-Verdau

1. Nachdem sich die Probe-PCR in Qualität und Quantität als ausreichend erwiesen hat, führen Sie die SURVEYOR Nuclease-Verdaureaktion wie nachstehend beschrieben durch. Für einen optimalen Verdau durch die SURVEYOR Nuclease wird eine Probenkonzentration von 40 ng/µL oder mehr benötigt.
2. Tauen Sie die Reaktionsgefäße mit 0.15 M $MgCl_2$ Solution und den SURVEYOR Enhancer Cofactor auf Eis auf.
3. Geben Sie 10,0 µL von allen oben genannten PCR-amplifizierten Proben in ein neues 0,2 mL-PCR-Reaktionsgefäß oder in die Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte.
4. Stellen Sie frische eine Mischung aus 0.15 M $MgCl_2$ SURVEYOR Enhancer Cofactor, SURVEYOR Enhancer W2 und SURVEYOR Nuclease W (SURVEYOR Nuclease-Reaktionsgemisch) her.

Bereiten Sie den SURVEYOR Nuclease Verdau-Master Mix für die Analyse mehrerer Proben anhand der folgenden Tabelle vor. Das Beispiel unten zeigt die Volumina für ein 10-Proben-Master Mix.

Berücksichtigen Sie, dass etwas mehr Master-Mix, als in dieser Berechnung angezeigt, benötigt wird, um Verluste während des Pipettierens auszugleichen.

Anzahl der SURVEYOR Nuclease-Verdaureaktionen:	**10**
Volumenberechnung:	
0.15 M $MgCl_2$ Solution (µL)	**10,0**
SURVEYOR Enhancer Cofactor (µL)	**10,0**
SURVEYOR Enhancer W2 (µL)	**10,0**
SURVEYOR Nuclease W (µL)	**20,0**
Master-Mix-Gesamtvolumen	**50,0**
Fügen Sie je **5 µL** SURVEYOR Nuclease Master-Mix den PCR-amplifizierten Proben hinzu (µL).	**10,0**
Gesamtvolumen SURVEYOR Nuclease-Verdaureaktion:	**15,0**

a. Vor dem Gebrauch alle Reagenzien zentrifugieren.

b. Vor dem Pipettieren jedes Reagenz leicht vortexen. Zentrifugieren Sie nach jedem Vortexschritt ~10 Sekunden leicht an.

c. Fügen Sie für jeden Verdau einem 0,2-mL- (oder größeren) PCR-Reaktionsgefäß folgende Komponenten hinzu.

1,0 µL 0.15 M $MgCl_2$ Solution (PN 708027)
1,0 µL SURVEYOR Enhancer Cofactor (PN 708049)
1,0 µL SURVEYOR Enhancer W2 (PN 710161)
2,0 µL SURVEYOR Nuclease W (PN 710160)

Oder fügen Sie 5 µL Master-Mix hinzu, der wie in der Tabelle oben vorbereitet wurde.

5. Vortexen Sie den SURVEYOR Nuclease Master Mix 10 Sekunden vorsichtig bei niedriger Geschwindigkeit
6. Zentrifugieren Sie den SURVEYOR Nuclease Digest Master Mix 10 Sekunden bei niedriger Geschwindigkeit.
7. Legen Sie den SURVEYOR Nuclease-Verdau Master Mix bis zur Weiterverarbeitung auf Eis.

Anmerkung: Der in Schritt 7 vorbereitete SURVEYOR Nuclease-Verdau-Master Mix muss sofort verwendet werden, da SURVEYOR Nuclease W mit der Zeit inaktiv wird, wenn sie mit den anderen Komponenten des SURVEYOR Nuclease Digest Master Mix in Berührung kommt.

8. Pipettieren Sie je 5,0 µL Aliquot des SURVEYOR Nuclease Master Mix in jedes Reaktionsgefäß oder jede Vertiefung, das bzw. die 10,0 µL Aliquot des amplifizierten PCR-Produkts enthält (siehe Schritt 3 oben).
9. Wenn Sie mit dem Pipettieren fertig sind, zentrifugieren Sie die 0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße bzw. die 96-Loch-Mikrotiterplatte 10 Sekunden lang.
10. Vortexen Sie die 0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße bzw. die 96-Loch-Mikrotiterplatte vorsichtig 10 Sekunden lang.
11. Zentrifugieren Sie 10 Sekunden bei niedriger Geschwindigkeit (dieser Schritt ist besonders wichtig, wenn der Verdau in einem Instrument ohne beheizten Deckel durchgeführt wird).
12. Inkubieren Sie 30 Minuten lang bei 42 °C.
13. Fügen Sie jedem Röhrchen bzw. jeder Vertiefung 1,0 µL SURVEYOR Stop Solution (PN 708030) hinzu, leicht vortexen (das SURVEYOR Nuclease-Gesamtreaktionsvolumen beträgt 16,0 µL).

TIPP: Die SURVEYOR-Verdauprodukte können bei ≤ -20 ºC bis zu einer Woche gelagert werden.

14. Laden Sie die Probenverdaus auf das DHPLC-System.

Anmerkung: Empfohlene Gradienteneinstellungen für die Analyse von SURVEYOR Nuclease-Verdauprodukte mit dem DHPLC-System finden Sie auf http://world.transgenomic.com/diagnostic-tools/genetic-analysis-kits/crc-rascan-kits-eu/dhplcsystemsettings.

13 Kontrollverfahren

13.1 Qualitätskontrolle für das CRC *RAS*can Combination Kit

Zur Qualitätskontrolle bestimmter Schritte des Testverfahrens sind diesem Kit Kontrollplasmid-DNAs beigefügt. Für das ***Amplifikationsprotokoll*** gewährleisten diese Kontrollen, dass der Master-Mix korrekt hergestellt wurde und die Amplifikation richtig funktioniert hat. No Template Controls (wo anstelle der Matrizen-DNA Wasser hinzugefügt wird) werden ebenfalls empfohlen, um eine mögliche Kontamination der Kitkomponenten mit einer DNA-Matrize nachzuweisen.

Bei dem Schritt des SURVEYOR Nuclease-Verdaus zeigen die Amplikons dieser drei Kontrollplasmid-DNAs effektiv, ob die Bedingungen der Spaltreaktion (Herstellung des SURVEYOR Nuclease Digest Master Mix und Inkubationsbedingungen) zufriedenstellend waren. Bei der Analyse geben die mit dem DHPLC System erstellten Chromatogramm dieser SURVEYOR Nuclease verdauten Kontrollamplikons einen Hinweis darauf, wo die Peaks der Spaltprodukte, die der Mutation in *KRAS* und *NRAS* Exons 2, 3 und 4 entsprechen, sogar bei geringer Konzentration, eluieren werden (siehe ***Abb. 4-10***). Peaks von Spaltprodukten, die zu anderen Mutationen in *KRAS* bzw. *NRAS* Exons 2, 3 und 4 gehören, können an leicht unterschiedlichen Positionen eluieren.

Wenn die PCR-Amplikons nicht den Ergebnissen in *Abschnitt* ***Qualitätskontrolle der PCR-Produkte*** entsprechen, sehen Sie in ***Anhang B - Fehlersuche*** nach oder setzen Sie sich mit dem Kundendienst von Transgenomic in Verbindung, bevor Sie weitere Schritte der Probenanalyse durchführen.

13.2 Verwendung von Kontrollplasmid-DNAs

Mit dem Kit werden neun Kontroll-DNAs geliefert:

KRAS Control Wild-Type; PN 710131

KRAS Positive Control Exon 2; PN 710135

KRAS Positive Control Exon 3; PN 710136

KRAS Positive Control Exon 4A; PN 710137

KRAS Positive Control Exon 4B; PN 710138

NRAS Control Wild-Type; PN 710441

NRAS Positive Control Exon 2; PN 710442

NRAS Positive Control Exon 3; PN 710443

NRAS Positive Control Exon 4; PN 710444

Diese Kontroll-DNAs sind Plasmide mit Insertionen. Die Positive Controls enthalten jeweils zwei Plasmide: eine Mischung aus *KRAS* oder *NRAS* Control Wild-Type und einem Mutationsklon, der sich vom Wild-Type in einem einzigen Basenpaar unterscheidet. Die Kontrollen werden in getrennten Reagenzgefäßen geliefert, jede in einer Konzentration von 10^5 Kopien/µL.

KRAS und *NRAS* Exons 2, 3 und 4 Forward und Reverse PCR-Primer, die für die PCR-Amplifikation benötigt werden, werden in den Kitkartons separat geliefert. Bitte befolgen Sie beim Gebrauch dieser Kontrollen die Anweisungen in ***Amplifikationsprotokoll***, ***SURVEYOR Nuclease Verdau*** und ***Analyse von KRAS und NRAS Exons 2, 3 & 4 mit der SURVEYOR Nuclease***.

ES WIRD PERSONEN, DIE DIESEN TEST ERSTMALS AUSFÜHREN, DRINGEND EMPFOHLEN, ZUNÄCHST TESTS MIT KONTROLLEN DURCHZUFÜHREN, BEVOR SIE GENOMISCHE PROBEN BEARBEITEN.

14 Interpretation der Ergebnisse

14.1 Analyse von *KRAS* und *NRAS* Exons 2, 3 und 4 mit der SURVEYOR Nuclease

Führen Sie zu Vergleichs- und Kontrollzwecken bei allen Kontrollen (Wild-Type und Positive Controls), einer No Template Control (NTC) sowie bei den Proben-DNAs **IMMER** den SURVEYOR Nuclease-Verdau durch und lassen diese auf derselben Probenplatte auf dem DHPLC-System durchlaufen.

In der Phase des SURVEYOR Nuclease-Verdaus überprüfen die Amplikons dieser Kontrollplasmid-DNAs effektiv, ob die Bedingungen der Spaltreaktion (Herstellung der SURVEYOR Nuclease-Mixtur und Inkubationsbedingungen) zufriedenstellend waren. Bei der Analyse liefert das DHPLC-System die Spuren dieser verdauten Kontrollamplikons der SURVEYOR Nuclease einen Anhaltspunkt, wo die DNA-Fragmente aus der Spaltung, auch bei geringer Konzentration, an den Mismatch-Stellen dieser spezifischen Mutation eluieren werden (siehe ***Abbildung 4-10***).

Wenn entweder die PCR-Amplikons oder die aus den Kontroll-DNAs stammenden SURVEYOR Nuclease-Spaltfragmente nicht den dargestellten Ergebnissen entsprechen, sehen Sie im ***Anhang B – Fehlersuche*** nach, oder wenden Sie sich an den technischen Kundendienst von Transgenomic, bevor Sie weitere Schritte der Probenanalyse durchführen.

Die Beispiele unten dienen nur zu Darstellungszwecken und dürfen **NICHT**verwendet werden, um die Identität einer gegebenen Mutation festzulegen. Die Bestätigung der Identität einer Mutation ist erforderlich, um eindeutig die Präsenz einer spezifischen Basenänderung in Exons 2, 3 oder 4 des *KRAS* bzw. *NRAS* -Gens zu bestimmen.

SURVEYOR Nuclease spaltet an allen Mismatches, die sich aus der Heteroduplex-Bildung von Wild-Type und mutanten DNAs ergeben – nicht nur Mutationen in Exon 2, 3 oder 4. Die

SURVEYOR Nuclease bestätigt, dass ein Mismatch vorhanden ist. Die mutationsspezifische Identität der Basenänderung ist zur Bestimmung des *KRAS*- und *NRAS*-Aktivierungsstatus erforderlich und muss durch eine andere Methode (z. B. Sequenzierung) bestätigt werden.

14.2 Datenprüfung der SURVEYOR Scan-Ergebnisse

Überprüfen Sie die Chromatogramme und vergleichen die der Wild-Type und Positive Controls mit denen der Probe. Bestimmen Sie, ob das Chromatogramm der Probe mit dem Wild-Type-Muster übereinstimmt oder differiert. Wenn es sich unterscheidet, dann sollte die Probe als „SURVEYOR Scan positiv" bewertet und zur DNA-Sequenzanalyse geschickt werden. Siehe Beispiele in ***Abbildung 4-10*** sowie ***Anhang B – Fehlersuche, Probleme 7 & 8*** für Beispiele solcher Proben.

Jede Probe mit einem SURVEYOR Nuclease-Muster, das sich von dem des Wild-Type unterscheidet, sollte für eine Sequenzbestätigung eingeschickt werden, selbst wenn sie nicht mit der Positive Control identisch ist Siehe ***Anhang B – Fehlersuche, Problem 7*** für ein Beispiel einer solchen Probe.

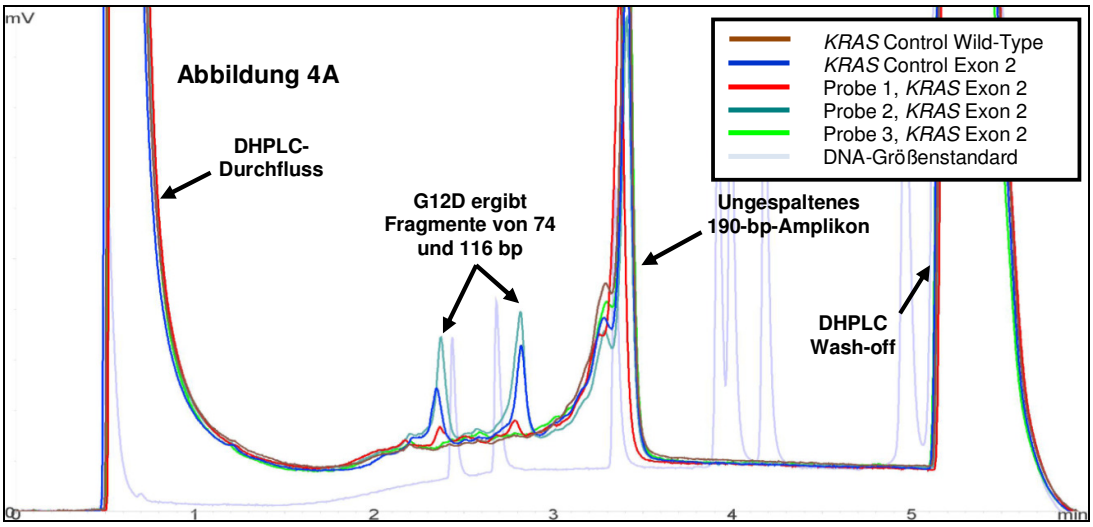
Falls erforderlich, zoomen Sie auf den Bildausschnitt und überblenden das Chromatogramm mit der Wild-Type Control für dieses Amplikon.

Dokumentieren Sie alle Unterschiede zwischen der Wild-Type Control und der analysierten Probe.

Wichtig! Für eine sorgfältige Prüfung jeder Probe sollte der Prüfer kontrollieren, ob nebeneinanderliegende Proben in der Analyseplatte identische positive SURVEYOR Scan Ergebnisse ausweisen. Das Auftreten identischer positiver Ergebnisse kann das Resultat einer Kreuzkontamination von Probe und Kontrolle sein. Die Analyse muss in dem Fall wiederholt werden.

14.3 Beispielergebnisse

Beispielergebnisse, die mit dem CRC *RAS*can Combination Kit und einem DHPLC-System erzielt wurden, zeigen die ***Abbildungen 4-10*** unten. In diesen Beispielen wurde unter Verwendung des WAVE® 4500HT-HS Systems mit UV- als auch Fluoreszenzdetektoren das im Abschnitt ***Schritt-für-Schritt-Anleitung*** dargestellte Verfahren genauestens eingehalten. Für Hinweise zu empfohlenen Gradienteneinstellungen für die Analyse von SURVEYOR Nuclease-Verdauprodukten mit dem DHPLC-System, gehen Sie auf http://world.transgenomic.com/diagnostic-tools/genetic-analysis-kits/crc-rascan-kits-eu/dhplcsystemsettings.



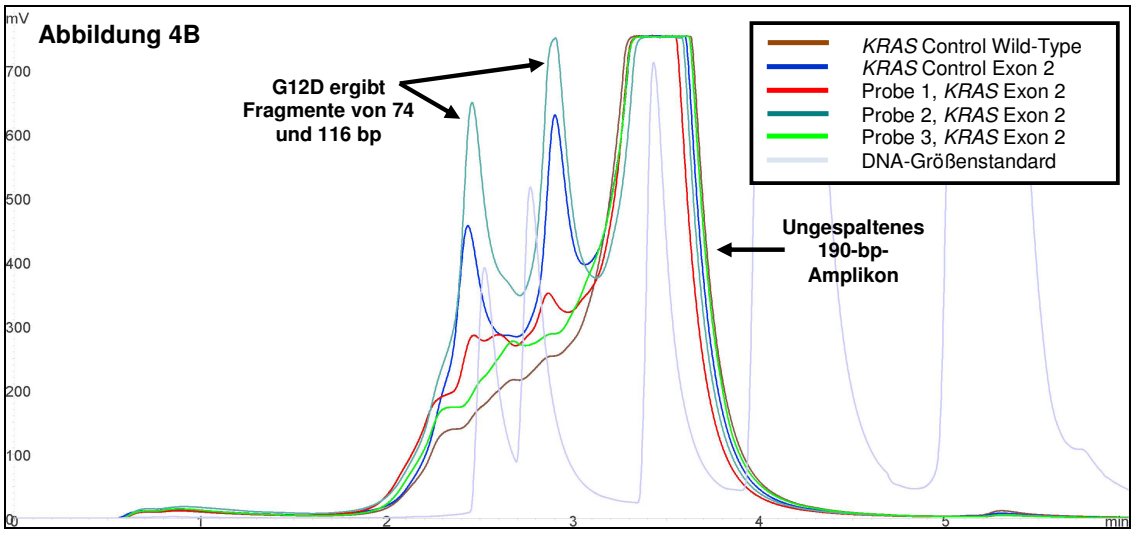


Abbildung 4A und 4B: WAVE DHPLC Analyse mit UV- (Abbildung 4A) und Fluoreszenz- (Abbildung 4B) Detektion von SURVEYOR Nuclease Verdauprodukten von *KRAS* Positive Control Exon 2, *KRAS* Control Wild-Type und CRC-DNA isoliert aus FFPE-Schnitten. Bei der Sichtprüfung der Chromatogramme sollten die verdauten Proben mit der Wild-Type Control (braune Linie) verglichen werden. Die *KRAS* Positive Control Exon 2 (blaue Linie) ist eine Mischung aus Wild-Type- und mutanten G12D-Plasmiden, die in Verdau-Peaks zu 74 und 116 bp resultieren; diese Kontrolle zeigt an, dass der SURVEYOR Nuclease Verdauschritt funktioniert hat, und weist auf dem Chromatogramm auf die Region zur Sichtprüfung hin, die bestimmt, ob eine Probe zur DNA-Sequenzanalyse geschickt werden sollte. Beim Vergleich der Verdaumuster der Proben 1-3 mit dem Elektropherogramm des unverdauten Wild-Type ist es offensichtlich, dass Proben 1 & 2 (rote & türkisfarbene Linie) möglicherweise Mutationen enthalten und sequenziert werden sollten, um Anwesenheit oder Fehlen einer Mutation am entsprechenden Codon zu

bestätigen. Die Probe 3 (grüne Linie) hat im Vergleich zur Wild-Type Control ähnliche Chromatogramme und muss nicht zur DNA-Sequenzanalyse geschickt werden. Bitte beachten Sie, dass das Sequenzierungsergebnis das endgültige Ergebnis darstellt, da es in derselben Fragmentgröße weitere nicht relevante Mutationen geben kann.

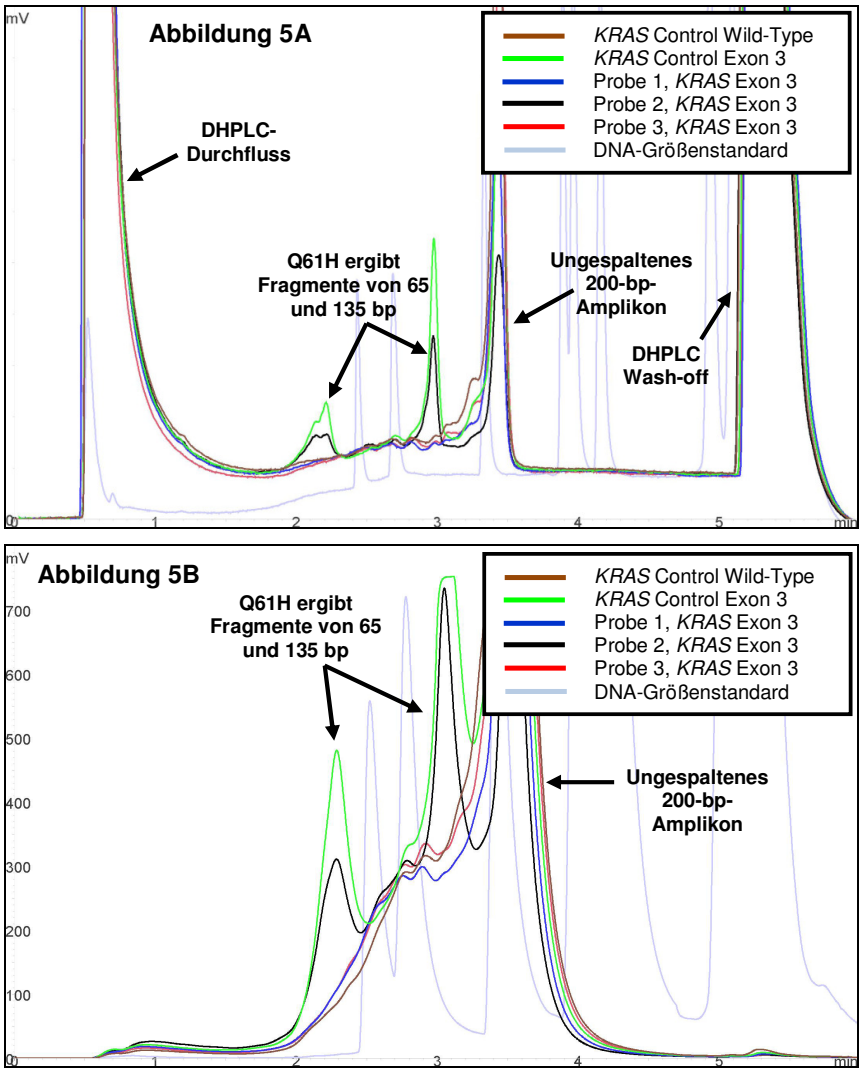
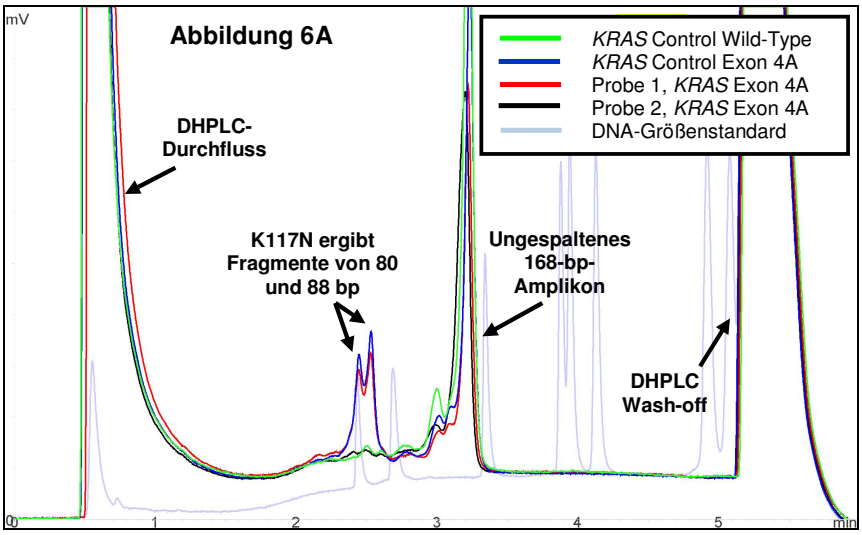


Abbildung 5A und 5B: WAVE DHPLC Analyse mit UV- (Abbildung 5A) und Fluoreszenz- (Abbildung 5B) Detektion von SURVEYOR Nuclease Verdauprodukten von *KRAS* Positive Control Exon 3, *KRAS* Control Wild-Type und CRC-DNA isoliert aus FFPE-Schnitten. Bei der Sichtprüfung der Chromatogramme sollten die verdauten Proben mit der Wild-Type Control (braune Linie) verglichen werden. Die *KRAS* Positive Control Exon 3 (grüne Linie) ist eine Mischung aus Wild-Type- und mutanten Q61H-Plasmiden, die in Verdau-Peaks zu 65 und 135 bp resultieren; diese Kontrolle weist darauf hin, dass der SURVEYOR Nuclease Verdauschritt funktioniert hat, und weist auf dem Chromatogramm auf die Region zur Sichtprüfung hin, die bestimmt, ob eine Probe zur DNA-Sequenzanalyse geschickt werden sollte. Beim Vergleich der Verdaumuster der Proben 1-3 mit dem Elektropherogramm des unverdauten Wild-Type ist es offensichtlich, dass Probe 2 (schwarze Linie) möglicherweise eine Mutation enthält und sequenziert werden sollte, um Anwesenheit oder Fehlen einer Mutation am entsprechenden Codon zu bestätigen. Die Proben 1 und 3 (blaue und rote Linie) haben im Vergleich zur Wild-Type Control ähnliche Chromatogramme und müssen nicht zur DNA-Sequenzanalyse geschickt werden. Bitte beachten Sie, dass das Sequenzierungsergebnis das endgültige Ergebnis darstellt, da es in derselben Fragmentgröße weitere nicht relevante Mutationen geben kann.



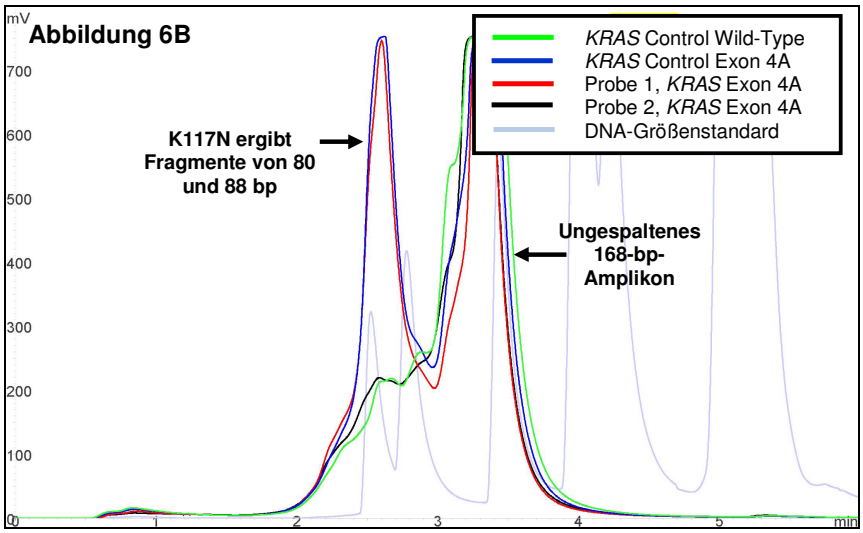
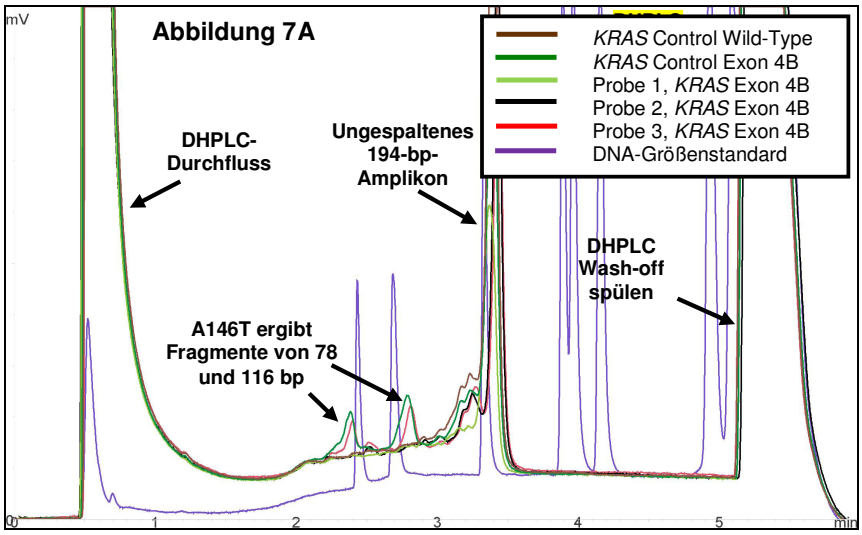


Abbildung 6A und 6B: WAVE DHPLC Analyse mit UV- (Abbildung 6A) und Fluoreszenz- (Abbildung 6B) Nachweis von SURVEYOR Nuclease Verdauprodukten von *KRAS* Positive Control Exon 4A, *KRAS* Control Wild-Type und CRC-DNA isoliert aus FFPE-Schnitten. Bei der Sichtprüfung der Chromatogramme sollten die verdauten Proben mit der Wild-Type Control (grüne Linie) verglichen werden. Die *KRAS* Positive Control Exon 4A (blaue Linie) ist eine Mischung aus Wild-Type- und mutanten K117N-Plasmiden, die in Verdau-Peaks zu 80 und 88 bp resultieren; diese Kontrolle weist darauf hin, dass der SURVEYOR Nuclease Verdauschritt funktioniert hat, und weist auf dem Chromatogramm auf die Region zur Sichtprüfung hin, die bestimmt, ob eine Probe zur DNA-Sequenzanalyse geschickt werden sollte. Beim Vergleich der Verdaumuster der Proben 1 & 2 mit dem Elektropherogramm des unverdauten Wild-Type ist es offensichtlich, dass Probe 1 (rote Linie) möglicherweise eine Mutation enthält und sequenziert werden sollte, um Anwesenheit oder Fehlen einer Mutation am entsprechenden Codon zu bestätigen. Die Probe 2 (schwarze Linie) hat im Vergleich zur Wild-Type Control ein ähnliches Chromatogramm und muss nicht zur DNA-Sequenzanalyse geschickt werden. Bitte beachten Sie, dass das Sequenzierungsergebnis das endgültige Ergebnis darstellt, da es in derselben Fragmentgröße weitere nicht relevante Mutationen geben kann.



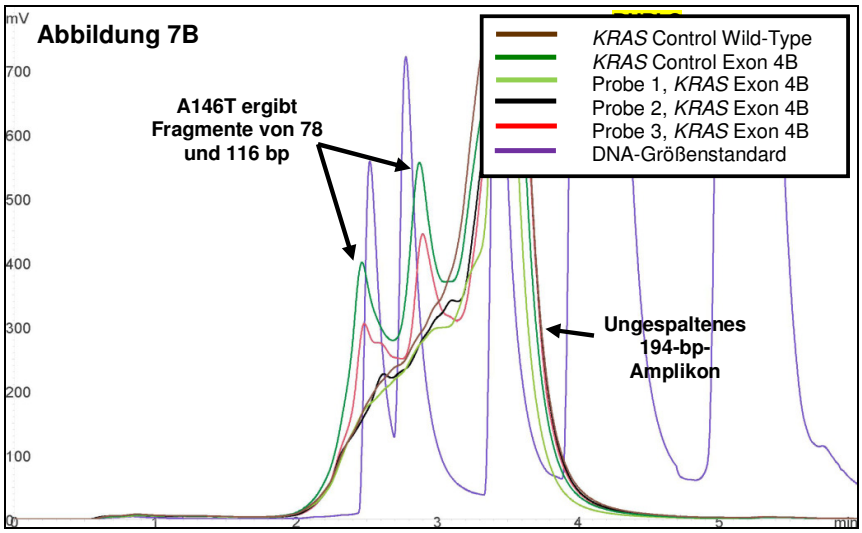


Abbildung 7A und 7B: WAVE DHPLC Analyse mit UV- (Abbildung 7A) und Fluoreszenz- (Abbildung 7B) Nachweis von SURVEYOR Nuclease Verdauprodukten von *KRAS* Positive Control Exon 4B, *KRAS* Control Wild-Type und CRC-DNA isoliert aus FFPE-Schnitten. Bei der Sichtprüfung der Chromatogramme sollten die verdauten Proben mit der Wild-Type Control (braune Linie) verglichen werden. Die *KRAS* Positive Control Exon 4B (dunkelgrüne Linie) ist eine Mischung aus Wild-Type- und mutanten A146T-Plasmiden, die in Verdau-Peaks zu 78 und 116 bp resultieren; diese Kontrolle weist darauf hin, dass der SURVEYOR Nuclease Verdauschritt funktioniert hat, und weist auf dem Chromatogramm auf die Region zur Sichtprüfung hin, die bestimmt, ob eine Probe zur DNA-Sequenzanalyse geschickt werden sollte. Beim Vergleich der Verdaumuster der Proben 1–3 mit dem Elektropherogramm des unverdauten Wild-Type ist es offensichtlich, dass Probe 3 (rote Linie) möglicherweise eine Mutation enthält und sequenziert werden sollte, um Anwesenheit oder Fehlen einer Mutation am entsprechenden Codon zu bestätigen. Die Proben 2 und 3 (schwarze und hellgrüne Linie) hat im Vergleich zur Wild-Type Control ähnliche Chromatogramme und muss nicht zur DNA-Sequenzanalyse geschickt werden. Bitte beachten Sie, dass das Sequenzierungsergebnis das endgültige Ergebnis darstellt, da es in derselben Fragmentgröße weitere nicht relevante Mutationen geben kann.

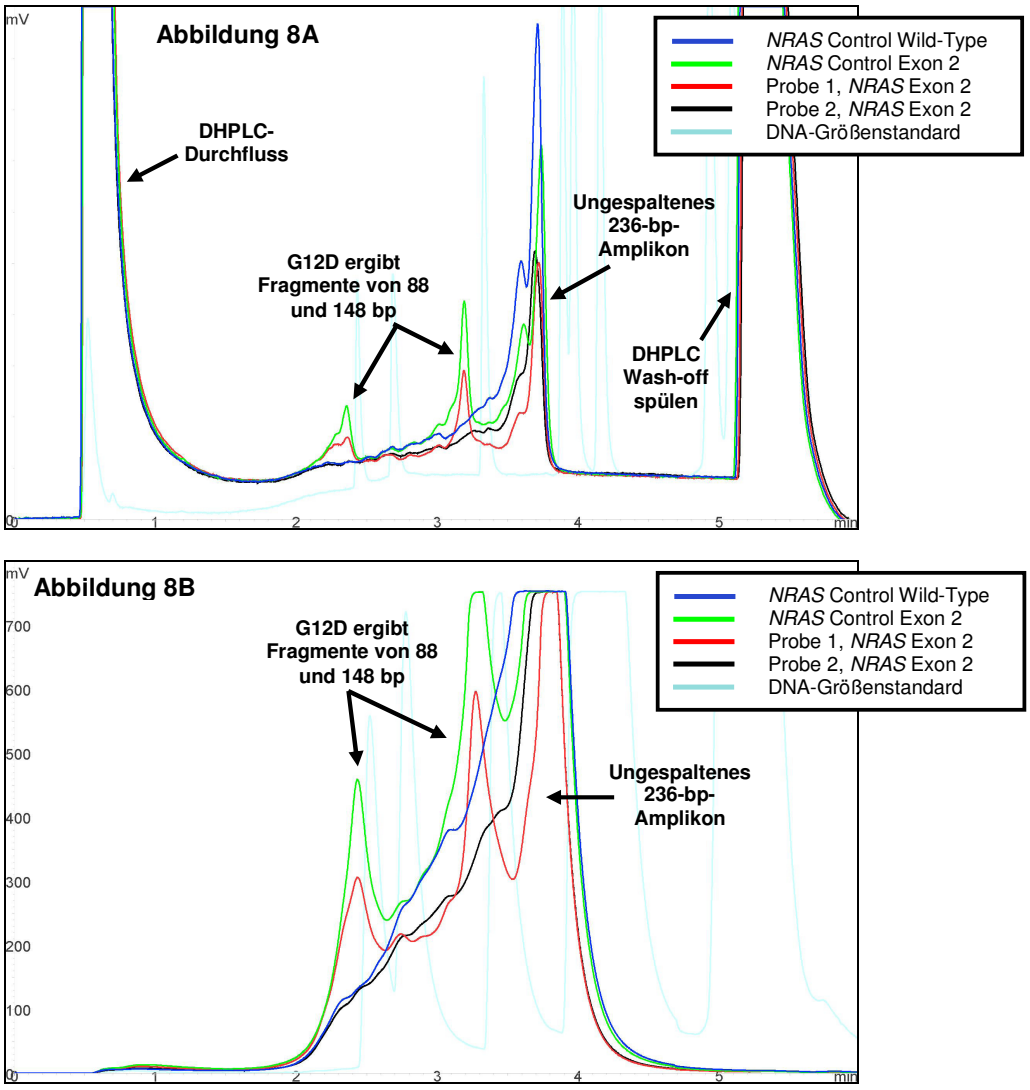


Abbildung 8A und 8B: WAVE DHPLC Analyse mit UV- (Abbildung 8A) und Fluoreszenz- (Abbildung 8B) Nachweis von SURVEYOR Nuclease-Verdauprodukten von *NRAS* Positive Control Exon 3, Wild-Type Controls und CRC-DNA isoliert aus FFPE-Schnitten. Bei der Sichtprüfung der Chromatogramme sollten die verdauten Proben mit der *NRAS* Control Wild-Type (blaue Linie) verglichen werden. Die *NRAS* Positive Control Exon 2 (grüne Linie) ist eine Mischung aus Wild-Type- und mutanten G12D-Plasmiden, die in Verdaupeaks zu 88 und 148 bp resultieren; diese Kontrolle weist darauf hin, dass der SURVEYOR Nuclease Verdauschritt funktioniert hat, und weist auf dem Chromatogramm auf die Region zur Sichtprüfung hin, die bestimmt, ob eine Probe zur DNA-Sequenzanalyse geschickt werden sollte. Beim Vergleich der Verdauungsmuster der Proben 1 und 2 mit dem Wild-Type-verdauten Elektropherogramm ist es offensichtlich, dass Probe 1 (rot Linie) möglicherweise eine Mutation enthält und sequenziert werden sollte, um Anwesenheit oder Fehlen einer Mutation am entsprechenden Codon zu bestätigen. Die Probe 2 (schwarze Linie) hat im Vergleich zur *NRAS* Control Wild-Type ein ähnliches Chromatogramm und muss nicht zur DNA-Sequenzanalyse geschickt werden. Bitte beachten Sie, dass das Sequenzierungsergebnis das endgültige Ergebnis darstellt, da es in derselben Fragmentgröße weitere nicht relevante Mutationen geben kann.

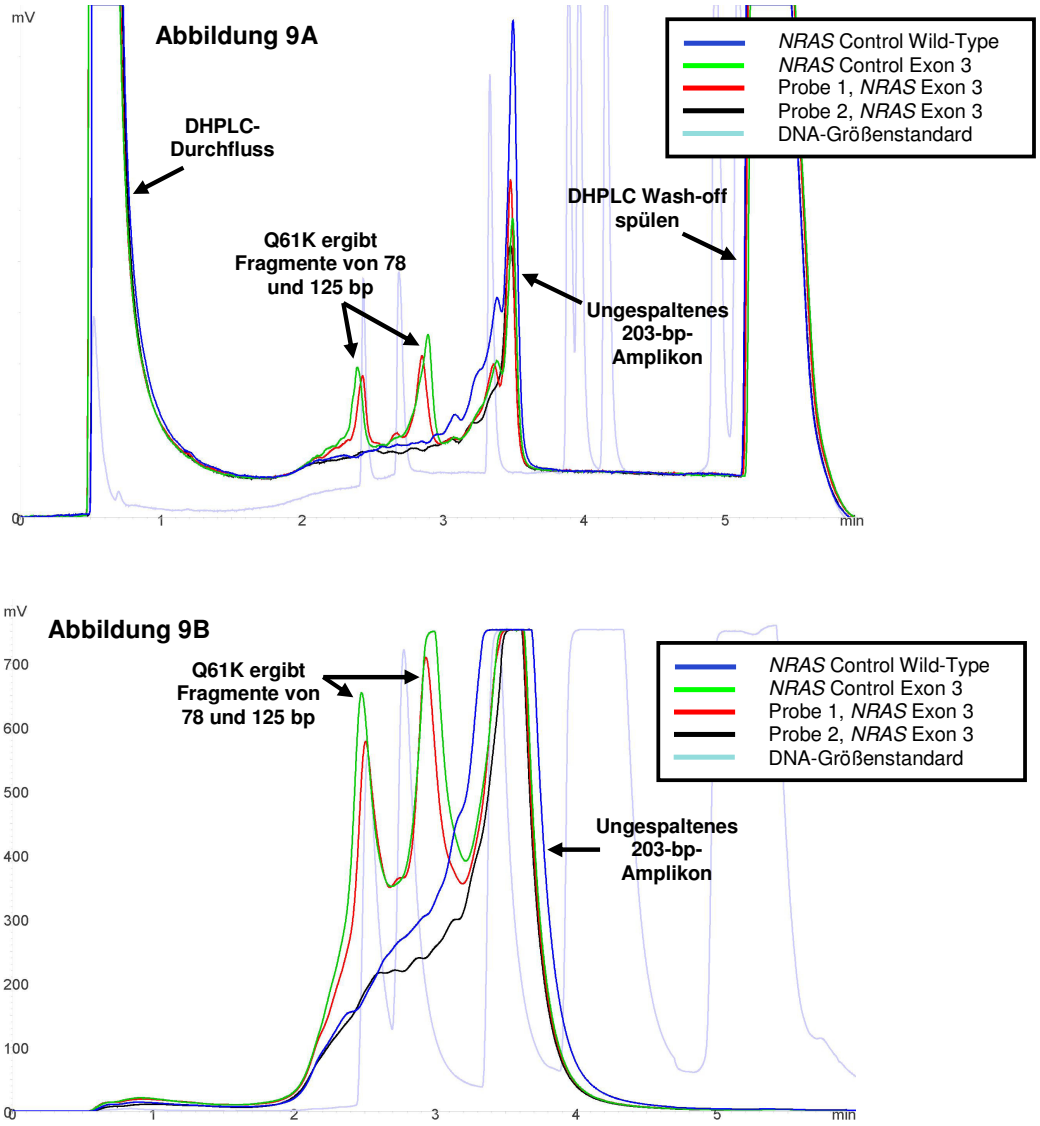
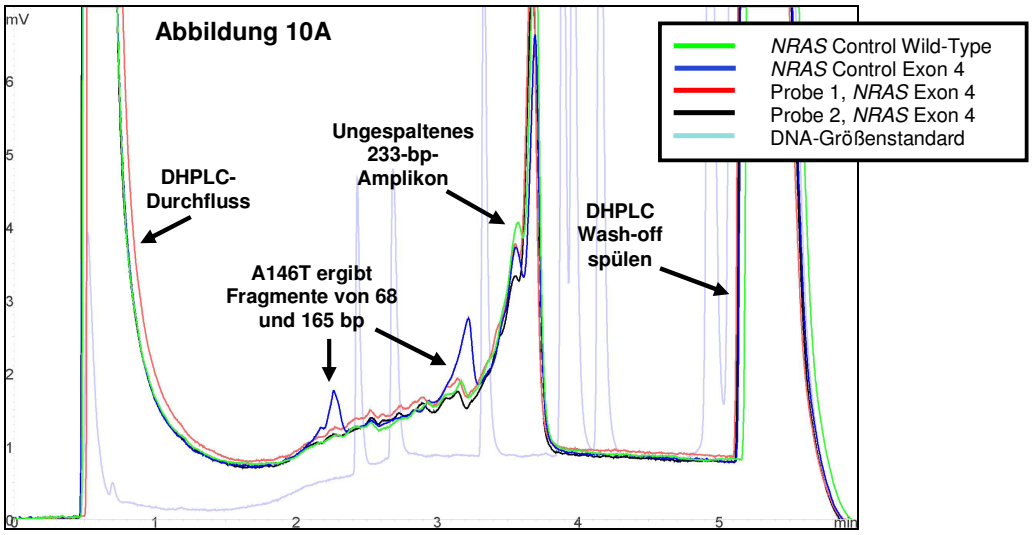


Abbildung 9A und 9B: WAVE DHPLC Analyse mit UV- (Abbildung 9A) und Fluoreszenz- (Abbildung 9B) Nachweis von SURVEYOR Nuclease-Verdauprodukten von *NRAS* Positive Control Exon 3 und Wild-Type Controls und CRC DNA isoliert aus FFPE-Schnitten. Bei der Sichtprüfung der Chromatogramme sollten die verdauten Proben mit der *NRAS* Control Wild-Type (grüne Linie) verglichen werden. Die *NRAS* Positive Control Exon 3 (blaue Linie) ist eine Mischung aus Wild-Type- und mutanten Q61K-Plasmiden, die in Verdaupeaks zu 78 und 125 bp resultieren; diese Kontrolle weist darauf hin, dass der SURVEYOR Nuclease Verdauungsschritt funktioniert und gibt auf dem Chromatogramm die Region zur Sichtprüfung an, mit der bestimmt werden sollte, ob eine Probe zur DNA-Sequenzanalyse geschickt werden sollte. Beim Vergleich der Verdauungsmuster der Proben 1 und 2 mit dem Wild-Type, das im Elektropherogramm verdaut ist, ist es offensichtlich, dass Probe 1 (rot Linie) möglicherweise eine Mutation enthält und sequenziert werden sollten, um die Anwesenheit oder das Fehlen einer Mutation am entsprechenden Codon zu bestätigen. Die Probe 2 (schwarze Linie) hat im Vergleich zur *NRAS* Control Wild-Type ein ähnliches Chromatogramm und muss nicht zur DNA-Sequenzanalyse geschickt werden. Bitte beachten Sie, dass das Sequenzierungsergebnis das endgültige Ergebnis darstellt, da es in derselben Fragmentgröße weitere nicht relevante Mutationen geben kann.



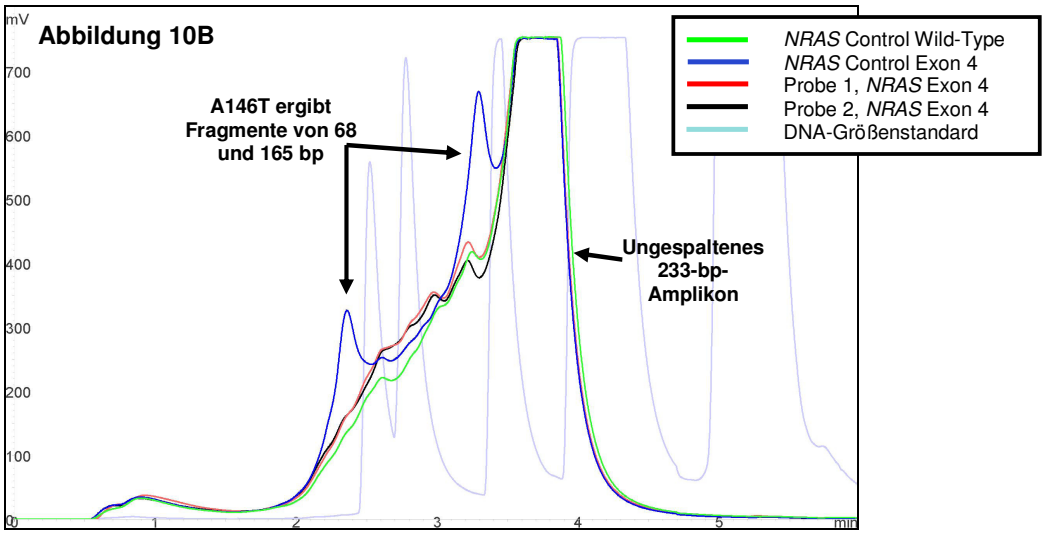


Abbildung 10A und 10: WAVE DHPLC Analyse mit UV- (Abbildung 10A) und Fluoreszenz- (Abbildung 10B) Nachweis von SURVEYOR Nuclease-Verdauprodukten von *NRAS* Positive Control Exon 4 und Wild-Type Controls und CRC DNA isoliert aus FFPE-Schnitten. Bei der Sichtprüfung der Chromatogramme sollten die verdauten Proben mit der *NRAS* Control Wild-Type (grüne Linie) verglichen werden. Die *NRAS* Positive Control Exon 4 (blaue Linie) ist eine Mischung aus Wild-Type- und mutanten A146T-Plasmiden, die in Verdaupeaks zu 68 und 165 bp resultieren; diese Kontrolle weist darauf hin, dass der SURVEYOR Nuclease Verdauungsschritt funktioniert und gibt auf dem Chromatogramm die Region zur Sichtprüfung an, mit der bestimmt werden sollte, ob eine Probe zur DNA-Sequenzanalyse geschickt werden sollte. Beim Vergleich der Verdauungsmuster der Proben 1 und 2 mit dem Wild-Type-verdauten Elektropherogramm ist es offensichtlich, dass Proben 1 und 2 (rot und schwarze Linie) ähnliche Chromatogramme wie für die *NRAS* Control Wild-Type zeigen und nicht zur DNA-Sequenzanalyse eingeschickt werden müssen. Bitte beachten, dass für positive Ergebnisse mit dem SURVEYOR Scan das Sequenzierungsergebnis das endgültige Ergebnis darstellt, da es in derselben Fragmentgröße weitere nicht relevante Mutationen geben kann.

15 Leistungsmerkmale

15.1 Nachweisgrenze von Mutationen mit SURVEYOR Scan-Kits

Die Validierung der SURVEYOR Scan Kits für DHPLC-Plattformen mit Plasmidklonen aller angezeigten Mutationen hat gezeigt, dass SURVEYOR Nuclease-Peaks in einer Mischung von 2-5% Mutant vor einem Wild-Type-Hintergrund nachgewiesen werden können.

Der automatischen Sequenzierungszuordnung der Vorwärts- und auch Rückwärtsstränge gelingt es häufig nicht, Mutationen mit Werten unter 10% in Gemischen mit Wild-Type-DNA zu erfassen. Zusammen mit den SURVEYOR Nuclease-Ergebnissen ist es möglich, die 5–10% mutanten SequenzierungsChromatogramm mit mehr Sicherheit zu interpretieren.

Wenn eine Probenanalyse ein positives SURVEYOR Scan-Ergebnis zeigt, aber mit der DNA-Sequenzierung keine *KRAS*- oder *NRAS*-Mutation detektiert wird, empfehlen wir, dass „Keine Variante erfasst“ als Ergebnis angegeben wird. Für weitere Einzelheiten siehe *Überlegungen zum Arbeitsablauf*.

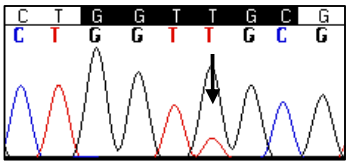
15.2. Sequenzbestätigung

Für alle positiven SURVEYOR Scan-Ergebnisse mit einer Sequenzbestätigung fortfahren, um die Sequenzidentität der Mutationen *KRAS oder NRAS* Exons 2, 3 oder 4 zu bestimmen. ***Abbildung 11*** stellt ein Beispiel für die Bedeutung einer Sequenzbestätigung dar für die Bestimmung der exakten Mutation.

Bei einem negativen Ergebnis des SURVEYOR Scan keine Sequenzbestätigung durchführen. Die Probe kann als Wild-Type oder „Keine Variante festgestellt" (No Variant Detected) angegeben werden.

Zur Sequenzbestätigung sollten die in diesem Kit enthaltenen Universal Sequencing Primer verwendet werden. Der Vorwärts-Primer hat die PN 710153F (Universal Sequencing Primer 1), der Rückwärts-Primer die PN 710153R (Universal Sequencing Primer 2).

Probe 1: G13C



Probe 2: G13D

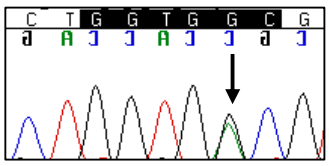


Abbildung 11 Sequenzanalyse von Proben mit demselben *KRAS* Exon 2 SURVEYOR Nuclease-Verdaumuster. Die Proben 1 und 2 oben zeigen nach SURVEYOR Nuclease-Verdau dasselbe DHPLC-Peakmuster und wurde mit DNA-Sequenzierung weiter analysiert. Die Sequenzierung zeigt, dass sie 2 unterschiedliche Mutationen sind: G13C und G13D. Diese Proben zeigen (a) die Fähigkeit der SURVEYOR Nuclease, potenzielle Mutationen nachzuweisen und (b) das Unvermögen, den genauen Mutationsort oder die spezifische Alteration der Basen einer oder mehrerer Mutation(en) in einer Probe nachweisen.

Anmerkung: Es ist wichtig, in jedem Sequenzierungselektropherogramm auf das Fehlen der „Stempel"-Sequenz zu prüfen, um zu bestätigen, dass die Mutation nicht aus einer Kontamination der Probe mit einer der Kitkontrollen resultiert.

Anmerkung: Wenn die getestete Probe an dem/den relevanten Codon(s) Wild-Type ist und die „gestempelte" Sequenz vorhanden ist, ist die Probe kontaminiert und muss erneut analysiert werden. Die Anwesenheit des „Stempels" weist darauf hin, dass die Probe mit einer der Wild-Type Controls des Kits kontaminiert sein könnte; diese Kontamination könnte eine in der probe vorhandene geringfügige Mutation maskieren. Siehe ***A.2 Kontroll-DNA-Stempel*** für weitere Einzelheiten zu den Stempelsequenzen der Kontrollen.

15.3 Verfahrensbeschränkungen

Von der Extraktion der formalinfixierten, paraffineingebetteten Proben übertragene kontaminierende Substanzen können ebenfalls PCR-Amplifikation und SURVEYOR Nuclease-Verdauvorgänge stören. Die in Verfahren zur ***Qualitätskontrolle von PCR-Produkten*** beschriebenen Vorgehensweisen zur Qualitätskontrolle gewährleisten, dass die extrahierte DNA zur Verwendung mit diesem Kit geeignet ist.

Dieses Kit wurde für die Verwendung mit formalinfixierten, paraffineingebetteten Biopsieproben von Kolorektaltumoren validiert. Eine Validierung für eine Verwendung mit anderen Krebsarten oder frischen bzw. tiefgefrorenen Biopsieproben besteht nicht.

Zur Fehlersuche nicht standardmäßiger Ergebnisse und Einzelheiten zu Faktoren, die diesen Test beeinträchtigen können, siehe ***Anhang B – Fehlersuche*** weiter unten.

Bei diesem Kit muss besonders darauf geachtet werden, Übertragung und Kreuzkontamination zu vermeiden. Die hohe Empfindlichkeit der Testmethode erfordert Vorsichtsmaßnahmen für folgende Punkte:

- Achten Sie darauf, dass alle Proben so gehandhabt werden, dass eine Kreuzkontamination zwischen ihnen nicht vorkommt.
- Arbeiten Sie an einem PCR-Arbeitsplatz oder in einem anderen geeigneten Raum, wo der Arbeitsbereich vor dem Aufbau von PCR-Amplifikationsreaktionen UV-Licht ausgesetzt werden kann.
- Verwenden Sie einen getrennten PCR-Arbeitsplatz bzw. Raum, um die Proben nach der PCR-Amplifikation für die Qualitätskontrolle durch Gelelektrophorese zu öffnen.
- Der Testaufbau für den SURVEYOR Nuclease-Verdau sollte in einem anderen Raum oder an einem anderen PCR-Arbeitsplatz von dem stattfinden, wo die erste PCR stattgefunden hat.
- Achten Sie darauf, dass bei allen Testschritten die Plasmidkontrollen des Kits von den Testproben getrennt gehandhabt werden.
    - Stellen Sie sicher, dass alle Lösungen, No Template Controls und Proben-DNA-Vertiefungen verschlossen sind, bevor Sie die Reaktionsgefäße mit der Kontrollplasmid-DNA öffnen.
    - **DIE KONTROLLEN ZULETZT BEARBEITEN**. Fügen Sie den entsprechenden Reaktionsgefäßen erst dann Kontrollplasmid-DNA hinzu, NACHDEM ALLE Vertiefungen mit No Template Control und Proben verschlossen wurden.
    - Wischen Sie ALLE Röhrchen und Verschlusskappen nach dem Verschließen der Kontroll-DNA-Röhrchen mit einem DNA-Zerstörungsmittel ab (z. B. 10% Bleiche), bevor Sie sie in einen anderen Bereich bringen.
- Achten Sie darauf, dass es beim Pipettieren in die 96-Loch-Mikrotiterplatte (beispielsweise durch Verspritzen während des Mischens oder durch nicht gewechselte Pipettenspitzen) nicht zu einer Kontamination der Proben in den angrenzenden Vertiefungen kommt.

Anhang A

A.1 Plattenlayout für SURVEYOR Scan-Kits

Das vorgeschlagene Plattenlayout gilt für die gleichzeitige Durchführung aller sieben *KRAS* und *NRAS* Exons mit der SURVEYOR Scan-Analyse an 10 Proben.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A: *KRAS* EX 2	*KRAS* Ex 2 WT	*KRAS* Ex 2 Mut	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10
B: *KRAS* EX 3	*KRAS* Ex 3 WT	*KRAS* Ex 3 Mut										
C: *KRAS* EX 4A	*KRAS* Ex 4A WT	*KRAS* Ex 4A Mut										
D: *KRAS* Ex 4B	*KRAS* Ex 4B WT	*KRAS* Ex 4B Mut										
E: *NRAS* EX 2	*NRAS* Ex 2 WT	*NRAS* Ex 2 Mut										
F: *NRAS* Ex 3	*NRAS* Ex 3 WT	*NRAS* Ex 3 Mut										
G: *NRAS* Ex 4	*NRAS* Ex 4 WT	*NRAS* Ex 4 Mut	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼
H:	Leer	Leer	Leer	Leer	Leer	NTC *KRAS* Ex 2	NTC *KRAS* Ex 3	NTC *KRAS* Ex 4A	NTC *KRAS* Ex 4B	NTC *NRAS* Ex 2	NTC *NRAS* Ex 3	NTC *NRAS* Ex 4

Schlüssel: Ex = Exon; WT = Wild-Type; Mut = Mutation; NTC = No Template Control.

A.2 Kontroll-DNA-Stempel

Im Folgenden werden die Sequenzen mit einem „Stempel" angegeben.

Schlüssel: Die häufigsten Mutationsregionen sind **Violett** markiert. Die Sequenz in GROSSBUCHSTABEN stellen codierende Basen dar; die Sequenz in Kleinbuchstaben stellen nicht-codierende Basen dar.

Die Kontrollen haben genetische „Stempel", die **Gelb** markiert sind; diese Variationen von der *KRAS* oder *NRAS* Wild-Type-Sequenz, in einem Bereich, in dem keine Mutationen erwartet werden, können verwendet werden, um Probleme mit der Probenkontamination durch Positive Controls zu erkennen. Siehe ***Anhang B - Fehlersuche***, ***Problem 8***, für ein Beispiel einer SURVEYOR Scan-Spur einer solchen Kontamination.

KRAS Exon 2 „Stempel"

Amplikongröße: 190 bp. Für die Herstellung des genetischen Stempels des *KRAS* Exon 2 Kontrollplasmids wird TAT gegen ATA ausgetauscht. Codon 12 und 13 sind unten ebenfalls markiert.

GCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAAATAGAT

KRAS Exon 3 „Stempel"

Amplikongröße: 200 bp. Für die Herstellung des genetischen Stempels des *KRAS* Exon 3 Kontrollplasmids wird ACC gegen TGG ausgetauscht. Codon 59 und 61 sind unten ebenfalls markiert.

GAATGGTGTCTCTTGGATATTCTCGACACAGCAGGTCAAGAG

KRAS Exon 4A „Stempel"

Amplikongröße: 168 bp. Für die Herstellung des genetischen Stempels des *KRAS* Exon 4A Kontrollplasmids wird AGA gegen TCT ausgetauscht. Codon 117 ist unten ebenfalls markiert.

AATAAATGTGATTTGCCTTCTAGAACAGTTCTCAC

***KRAS* Exon 4B „Stempel"**

Amplikongröße: 194 bp. Für die Herstellung des genetischen Stempels des *KRAS* Exon 4B Kontrollplasmids wird `agt` gegen `tca` ausgetauscht. Codon 146 ist unten ebenfalls markiert.

TCAGCAAAGACAAGACAGgtatcaaac

***NRAS* Exon 2 „Stempel"**

Amplikongröße: 236 bp. Für die Herstellung des genetischen Stempels des *NRAS* Exon 2 Kontrollplasmids wird `aca` gegen `tgt` ausgetauscht. Codon 12 und 13 sind unten ebenfalls markiert.

ccatgtggttcttgctggtgtgaaATGACTGAGTACAAACTGGTGGTGGTTGGAGCAGGTGGTGTT

***NRAS* Exon 3 „Stempel"**

Amplikongröße: 203 bp. Für die Herstellung des genetischen Stempels des *NRAS* Exon 3 Kontrollplasmids wird `GAC` gegen `CTG` ausgetauscht. Codon 59 und 61 sind unten ebenfalls markiert.

ACAGCTGGACAAGAAGAGTACAGTGCCATGAGACTGCAA

***NRAS* Exon 4 „Stempel"**

Amplikongröße: 233 bp. Für die Herstellung des genetischen Stempels des *NRAS* Exon 4 Kontrollplasmids wird `CAA` gegen `GTT` ausgetauscht. Codon 117 und 146 sind unten ebenfalls markiert.

AACAAGTGTGATTTGCCAACAAGGACAGTTGATACAAAAGTTGCCCACGAACTGGCCAAGAGTTACGGG
ATTCCATTCATTGAAACCTCAGCCAAG

A.3 HPLC (DHPLC) Systemanforderungen für die Denaturierung

A.3.1 DHPLC Spezifikationen für SURVEYOR SCAN Anwendungen

Die folgenden Spezifikationen stellen die Mindestanforderungen für die DHPLC-Systemspezifikationen für die Durchführung der Tests mit dem SURVEYOR Scan *KRAS* & *NRAS* Kit dar.

Abgabesystem für Hochleistungslösungsmittelgradienten

- Binäre Gradientenkapazität; Hochdruck oder Niederdruck
- Durchflussregulierung, Mindestbereich: 0,7 – 1,6 mL/min
- Durchflussgenauigkeit: ± 2% (H_2O bei 20 ºC)
- Lösungsmittelentgaser

Auto-Sampler

- Temperaturregulierung zum Abkühlen der Platten, einstellbar: 4 bis 14 ºC
- Injektionsvolumen: 5–50 µL

Trennkartusche

- Entwickelt für die Größentrennung von dsDNA-Fragmenten, Fragmentgröße 50 bp bis 250 bp

Säulenofen mit hoch präziser Temperaturregelung

- Temperaturbereich: 40 bis 70 ºC
- Temperaturgenauigkeit: ± 0,2 ºC
- Temperaturreproduzierbarkeit: ± 0,2 ºC
- Linearität über vollständigen Temperaturbereich: ± 2,0 ºC

Alternative Nachweismethode 1

- **UV/VIS-Detektor**
  - Wellenlängenbereich 190 – 700 nm
  - UV-Quelle: Deuteriumlampe

Alternative Nachweismethode 2

- **Fluoreszenz-Detektor**
  - Wellenlängenbereich: Anregung: 200 – 850 nm; Emission: 250 – 900 nm
  - Fluoreszenzquelle: 150 W Xenonlampe
- **Pumpe für Fluoreszenzfarbstoff**
  - Feste Durchflussrate bei 0,1 mL/min – 20%/+50%
  - Pulsationsarmer Durchfluss

A.3.2 Systembetrieb

Zu Installation und Betrieb des DHPLC-Systems richten Sie sich nach den Empfehlungen des Herstellers zur Analyse von dsDNA-Fragmenten in der Größenordnung von 50 bp bis 250 bp mit einer Zielauflösung von mindestens 10 bp. Dies ist der Größenbereich für Fragmente nach SURVEYOR Nuclease-Verdau mit diesem Kit.

Für Hinweise zu empfohlenen Gradienteneinstellungen für die Analyse von SURVEYOR Nuclease-Verdauprodukten mit dem DHPLC-System, gehen Sie auf http://world.transgenomic.com/diagnostic-tools/genetic-analysis-kits/crc-rascan-kits-eu/dhplcsystemsettings.

A.3.3 Wartung der DHPLC Kartuschen

Für die Wartung der DHPLC-Kartuschen befolgen Sie die Empfehlungen des Herstellers.

Anmerkung: Die Analyse von SURVEYOR Nuclease-Reaktionen erfordert häufigere und strengere Reinigungsprotokolle als für die normale PCR-Probenanalyse. Für weitere Einzelheiten siehe die Anweisungen Ihres DHPLC-Systems

A.4 Laboreinrichtung für PCR-Tests

Um zuverlässige und kontaminationsfreie PCR-Ergebnisse zu erhalten, halten Sie sich bei der Einrichtung der PCR-Labors an die gute Laborpraxis.

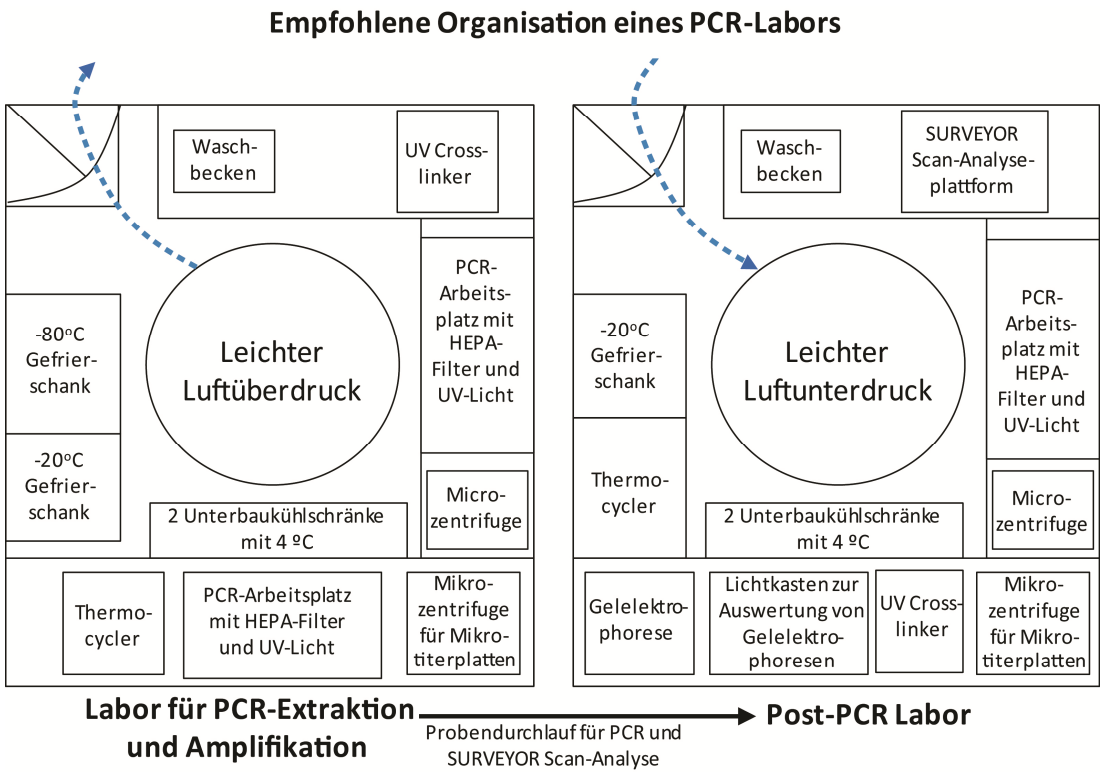
Denken Sie bei der Planung des Laboraufbaus an den Bedarf an räumlicher Trennung der Arbeitsbereiche Prä-Amplifikation und Post-Amplifikation. Es ist wichtig, Folgendes zu trennen: (i) DNA-Isolierung; (ii) Prä-Amplifikation und (iii) Post-PCR-Aktivitäten wie das Öffnen von Röhrchen mit amplifizierter Probe für die Durchführung von Gelelektrophoresen oder zum Vorbereiten anderer Tests wie SURVEYOR Nuclease-Verdau und DNA-Sequenzierung.

Es ist auch wichtig, dass Laborverbrauchsmaterial und Laborausrüstung speziell für diese Arbeitsbereiche gekennzeichnet sind und ausschließlich in diesem Bereich verwendet werden. Abwischen von Oberflächen mit einer wöchentlich frisch zubereiteten Bleiche 10% (v/v) ist hilfreich bei der Elimination von DNA-Fragmenten ≤ 500 bp als Matrizen für PCR. Darüber hinaus kann es nützlich sein, Kunststoffprodukte und Lösungen mit einem UV-Crosslinker 7–10 Minuten kurzwelliger UV-Strahlung auszusetzen.

Anmerkung: Enzyme und DNA, die amplifiziert werden sollen, **dürfen nicht** mit UV-Strahlung behandelt werden.

Zur Reduzierung von Kontamination vorschriftsmäßige Schutzkleidung tragen, häufig Handschuhe wechseln und, bevor man sich zum Arbeitsbereich begibt, die behandschuhten Hände mit 10% (v/v) Bleiche abwischen.

Die Einrichtung sollte zumindest der Zweiraumaufteilung in dem Diagramm unten entsprechen, die speziell für PCR und Analysen mit der SURVEYOR Nuclease entwickelt wurde.



A.5 Literaturnachweis

1. Amgen News Release (2013) New analyses identify predictive biomarkers for Vectibix® (panitumumab) in patients with metastatic colorectal cancer. http://wwwext.amgen.com/media/media_pr_detail.jsp?-year=2013&releaseID=1820728
2. Peeters M *et al* (2013) Massively parallel tumor multigene sequencing to evaluate response to panitumumab in a randomized phase III study of metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res. 19 1902-12*
3. De Roock W *et al* (2010) Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA 304 1812-20*
4. Peeters M *et al* (2013) Mutant KRAS codon 12 and 13 alleles in patients with metastatic colorectal cancer: assessment as prognostic and predictive biomarkers of response to panitumumab. *J Clin Oncol. 31 759-65*
5. Andre T *et al* (2013) Panitumumab combined with irinotecan for patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer refractory to standard chemotherapy: a GERCOR efficacy, tolerance, and translational molecular study. *Ann Oncol. 24 412-9*
6. Loupakis F *et al* (2009) KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in *KRAS* codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer 101 715-21*
7. De Roock W *et al* (2010) Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol. 11 753-62*
8. Qiu P *et al* (2004) Mutation detection using Surveyor™ nuclease. *Biotechniques 36 702-707*
9. Kuang Y *et al* (2009) Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. 15 2630-6*
10. Mitani N *et al* (2007) Surveyor nuclease-based detection of p53 gene mutations in haematological malignancy. *Ann. Clin. Biochem. 44 557-9*
11. Engelman JA *et al* (2006) Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. *J. Clin. Invest. 116 2695-2706*

Siehe auch http://world.transgenomic.com/files/literature/482146.pdf für Literaturhinweise zur SURVEYOR Nuclease und ihre Anwendungen.

Anhang B

Fehlersuche

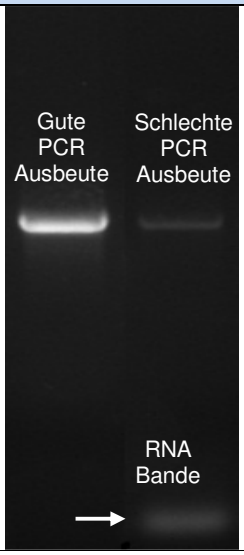
Die effektive Verwendung der SURVEYOR Scan-Kits für DHPLC hängt von der erfolgreichen Ausführung einer Reihe von Arbeitsschritten ab. Einer der entscheidendsten ist die PCR-Amplifikation, die zur Produktion einer ausreichenden Menge spezifischer, gleichmäßig langer DNA führen muss, um nach der Hybridisierung und Spaltung nachgewiesen zu werden. Das wiederum hängt von der Qualität der Ausgangsprobe ab. Die Durchführung dieses Tests mit DNA, die nicht den Qualität- und Quantitätskriterien entspricht, ist nicht empfehlenswert.

Anmerkung: Wenn Sie zum ersten Mal mit SURVEYOR Nuclease arbeiten, führen Sie die Untersuchungen im Abschnitt ***Verwendung von Kontrollplasmid-DNAs*** durch, nachdem Sie den Abschnitt ***Schritt-für-Schritt-Anleitung*** gelesen und verinnerlicht haben. Bevor Sie sich an den technischen Kundendienst von Transgenomic wenden, warten Sie bitte die Ergebnisse für die Kontrollplasmid-DNAs ab.

Diese Fehlersuche deckt eine Liste von Problemen ab, die bei der Arbeit mit den SURVEYOR Scan-Kits für DHPLC auftreten können, sowie Vorschläge, wie sie zu lösen sind. Die aufgezeigten Beispiele gelten für die *KRAS* sowie für die *NRAS* Exons.

Konsultieren Sie das Bedienungshandbuch des DHPLC-Systems für detaillierte Anleitungen in Bezug auf Gerätebetrieb und Wartung. Das Bedienungshandbuch enthält spezifische Verfahren zur Überprüfung und Wartung der Säulenleistung und beinhaltet Einzelheiten zur Fehlersuche.

Problem 1 – Niedrige PCR-Ausbeute oder kein PCR-Produkt, wenn auf Agarosegel analysiert

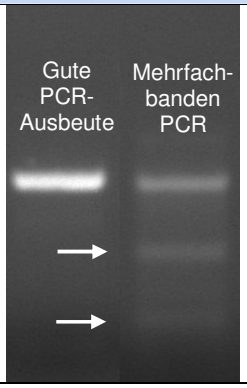
NIEDRIGE PCR-AUSBEUTE	MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
	Schlechte Qualität der DNA-Matrize	Wiederholen Sie die Aufreinigung der DNA. Überprüfen Sie die verwendete Aufreinigungsmethode. Wenn die FFPE-extrahierte DNA zu fragmentiert ist, können alternative FFPE-Blocks erforderlich sein.
	Zu viel RNA in der Probe verursacht die Überbewertung der DNA-Konzentration	Wiederholen Sie die RNase Behandlung der DNA-Probe und reinigen Sie die DNA erneut.
	Thermocycler nicht kalibriert	Führen Sie die Kalibrierung des Thermocyclers durch.
	Nicht ausreichende Matrize	Erhöhen Sie die Matrizenmenge.

Anmerkung: Es sollte hochwertige DNA aus FFPE verwendet werden. Die DNA sollte eine durch Absorption bei 260 nm gemessene Konzentration von 12.5 ng/µL aufweisen, sowie ein Absorptionsverhältnis von 260:280 nm von größer 1,8 haben und größer als 90% DNA sein (d. h. nahezu frei von tRNA- und rRNA-Kontamination laut Agarosegelauswertung). DNA-Proben zwischen -20 °C und -80 °C aufbewahren.

Die Analyse von DNA-Matrize, die aus paraffineingebettetem Gewebe extrahiert wurde, erfordert mehrere Vorsichtsmaßnahmen. Die DNA kann mit Uracil-DNA-Glycosylase behandelt werden, um eine Amplifikation von DNA-Fragmenten zu vermeiden, die deaminierte C-Reste enthalten. Häufig wird ein hoher Prozentsatz des aus dem paraffineingebetteten Gewebe extrahierten A_{260} Adsorptionsmittels bei der PCR nicht gut amplifiziert. Oft hilft eine größere Menge Start-DNA, um ein geeignetes Amplifikationsprodukt zu erhalten. Eine weitere Überlegung wäre, FFPE-Tumorschnitte mit einem hohen Prozentanteil an Tumorzellen zu wählen. Mikrodissektion kann

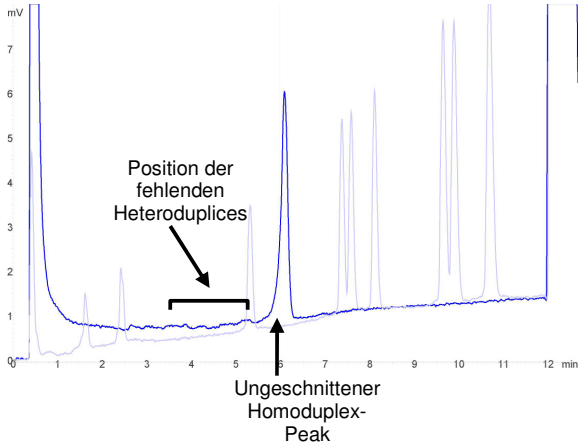
ebenfalls verwendet werden, ist aber zeitaufwendig und für das normale Routinelabor nicht empfehlenswert.

Problem 2 – Mehrere PCR-Produkte, wenn auf Agarosegel analysiert

MEHRERE PCR-PRODUKTE	MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
	Anlagerungstemperatur zu niedrig	Überprüfen Sie die Kalibrierung des Thermocyclers.

Anmerkung: PCR sollte einen ausreichend hohen Ertrag (größer als 20 ng/µL) einer EINZELNEN amplifizierten Spezies der richtigen Länge erzeugen. Für die PCR muss die in diesem Kit mitgelieferte **DNA Polymerase** und der **DNA Polymerase 10X PCR Buffer** verwendet werden. Amplikons aus Kontrollen müssen mit der SURVEYOR Nuclease verdaut und analysiert werden, um durch Sichtprüfung der Chromatogrammprofile störendes Hintergrundrauschen auszuschließen (siehe **Beispielergebnisse, Abbildung 4-10**). Kontrollieren Sie vor dem Verdau jedes amplifizierte DNA-Produkt durch Gelelektrophorese (oder durch Analyse mit dem DHPLC-System), um sicherzugehen, dass es eine einzelne Spezies der erwarteten Länge ist.

Problem 3 – Keine Spaltprodukte bei der Analyse nach SURVEYOR Nuclease-Behandlung der Heteroduplices

KEINE SPALTPRODUKTE	MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
	Anteil an Mismatch-Ziel zu gering	Test anhand der Kontrollen überprüfen.
	Ineffiziente Bildung von Heteroduplices	Führen Sie das PCR- und Hybridisierungsverfahren genau nach Anleitung durch. Verwenden Sie für den SURVEYOR Nuclease-Verdau frisch hybridisierte DNA. Wiederholen Sie die PCR-Amplifikation mit (1) derselben Menge DNA-Matrize, (2) erhöhen Sie die Menge Start-DNA, oder (3) isolieren Sie frische DNA von demselben oder einem anderen FFPE-Schnitt.
	Inaktive SURVEYOR Nuclease	Führen Sie die Reaktion mit Positive Control durch, um die Enzymleistung zu verifizieren. Nur frisch hergestellten SURVEYOR Nuclease Master-Mix verwenden.

Anmerkung: SURVEYOR Nuclease spaltet überwiegend bei Mismatches in Heteroduplices. Das Verhältnis von Heteroduplex zu Homoduplex in der hybridisierten Probe bestimmt das Verdausignal in der SURVEYOR Nuclease. Wenn die *KRAS*- oder *NRAS*-Mutation in der genomischen DNA-Probe in sehr geringer Konzentration vorliegt, kann das Signal für ein positives Ergebnis zu niedrig sein.

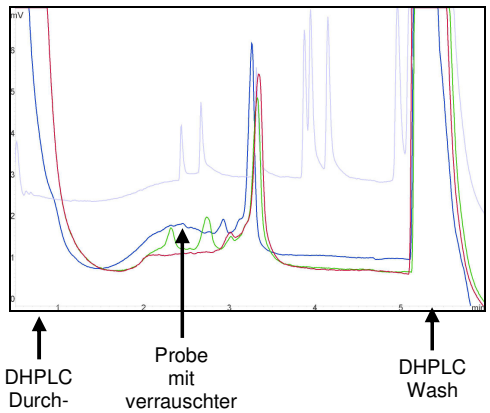
Es ist wichtig, darauf zu achten, dass der Hybridisierungsschritt im Thermocycler-Programm enthalten ist (siehe ***Amplifikationsprotokoll***), um die Leistung der Heteroduplexbildung zu optimieren. Heteroduplices werden bei Standard-PCR-Reaktionen mit sehr geringem Ertrag gebildet.

Anmerkung: Der Signal-Rausch-Abstand ist im Allgemeinen hoch genug, um Mutationen mit einem geringeren Prozentsatz der Gesamt-DNA-Matrize nachzuweisen. Es ist möglich, bis 2% mutante DNA zu detektieren. ***Abbildung 4-10*** zeigt die mit Homoduplex und Heteroduplex *KRAS* und *NRAS* Positive Control-DNAs (in diesem Kit enthalten) und FFPE-Proben generierten Verdauprodukte auf einem WAVE DHPLC 4500 System. Die Spaltprodukte sind deutlich als zwei neue Peaks zu erkennen, die mit der erwarteten Länge eluiert wurden, die anhand des DNA-Längenstandards berechnet werden können.

Achtung: Im Handel erhältliche PCR-Puffer unterscheiden sich stark in der Zusammensetzung und häufig ist die Zubereitung vom Hersteller nicht genau gekennzeichnet. Mehrere Puffer sind aufgrund von pH oder Zusatzstoffen, Tensiden oder anderen herstellereigenen Inhaltsstoffen mit

der SURVEYOR Nuclease **NICHT** kompatibel. **Verwenden Sie KEINE andere als die im Kit enthaltenen Polymerase oder 10X Polymerase-Puffer.**

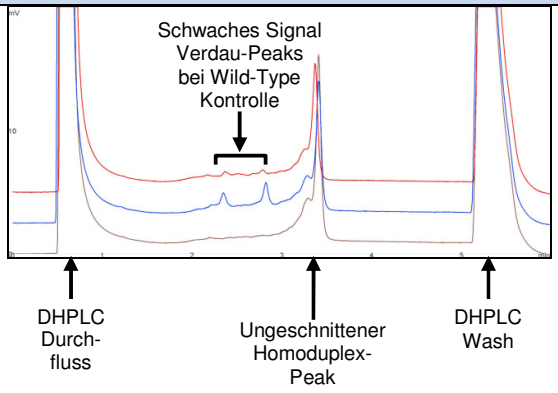
Problem 4 – Hohes Hintergrundrauschen nach SURVEYOR Nuclease-Behandlung

HOHES HINTERGRUNDRAUSCHEN	MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
	Nicht optimaler Hybridisierungsschritt	Führen Sie folgende Schritte durch: 1. Vergewissern Sie sich, dass sich die DNA-Konzentration im Bereich >12.5 ng/µL befindet. 2. Wiederholen Sie den Schritt Heteroduplex-Bildung, achten Sie dabei darauf, das empfohlene Verfahren einzuhalten; siehe 12.7.1.
	DNA-Menge zu niedrig	Überprüfen Sie die Ergiebigkeit und Qualität der DNA-Matrize
	Nicht-spezifische PCR-Produkte	Überprüfen Sie die Ergiebigkeit und Qualität der DNA-Matrize.
	SURVEYOR Enhancer W2 und/oder SURVEYOR Enhancer Cofactor wurden deaktiviert.	Überprüfen Sie das Ablaufdatum des Kits.

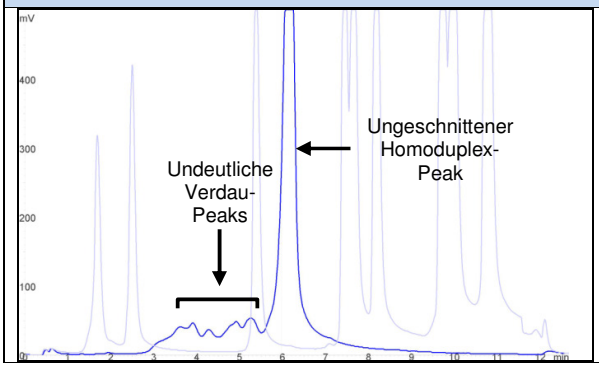
Anmerkung: Die SURVEYOR Nuclease schneidet gelegentlich bei doppelsträngigen DNAs an zufällig ausgewählten Gen-Orten ein. Dies erzeugt nach dem Verdau ein Hintergrundrauschen. Diese Aktivität wird durch den SURVEYOR Enhancer W2 und seinen Cofactor unterdrückt, ohne ansonsten die Mismatch-Spaltreaktionen negativ zu beeinträchtigen. SURVEYOR Enhancer W2 und SURVEYOR Enhancer Cofactor sind in diesem Kit enthalten und sollten immer verwendet werden.

Wenn dieses Anschneiden weiter auftritt, werden kleine Peaks auf dem DHPLC-System erzeugt. Der Wild-Type Control-Verdau zeigt dieselben kleinen Peaks. Dieser Vergleich wird verwendet, um Unterschiede in den Mustern der Chromatogramm zwischen Wild-Type Control und der getesteten Proben aufzufinden. Es wird beim Vergleich vom Muster der Probe mit der Wild-Type Control angewendet.

Problem 5 – Peaks des SURVEYOR Nuclease-Verdaus bei Negativkontrollen

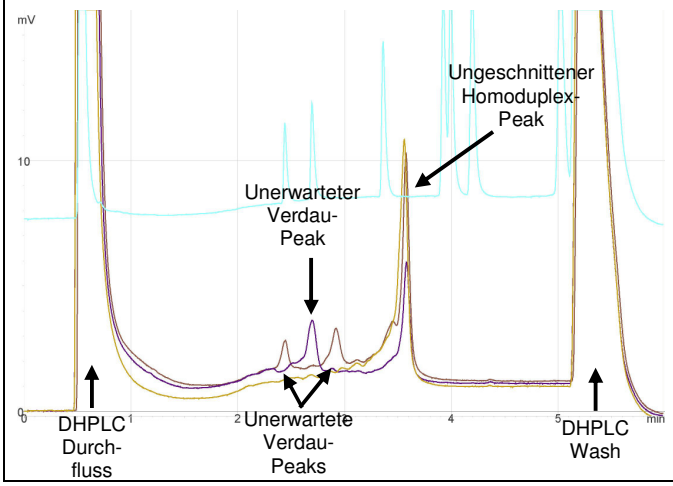
VERDAU-PEAKS BEI NEGATIVKONTROLLEN	MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
	Kontamination von Kit-Bestandteile mit *KRAS*- oder *NRAS*-Amplikons oder Plasmidkontrollen.	**Alle Kit-Komponenten entsorgen und ein neues Kit verwenden**. Kontaktieren Sie den Technischen Kundendienst von Transgenomic, um potenzielle Ursachen und Quellen der Kontamination zu besprechen.

Problem 6 – Fehlgeschlagene SURVEYOR Nuclease-Ergebnisse

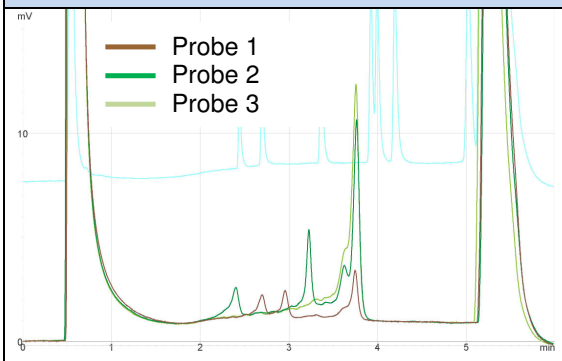
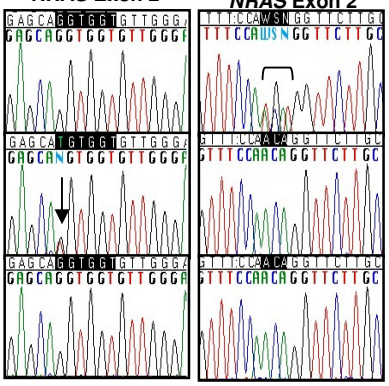
DER SURVEYOR NUCLEASE-VERDAU DER POSITIVE CONTROLS IST FEHLGESCHLAGEN	MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
	SURVEYOR Nuclease nicht hinzugefügt	Eine neue Probe verdauen.
	SURVEYOR Nuclease-Verdau wurde bei falscher Temperatur durchgeführt.	Eine neue Probe verdauen.

Problem 7 – Unerwartete Peaks in SURVEYOR Nuclease-Verdauspur

DER SURVEYOR NUCLEASE-VERDAU DER POSITIVE CONTROLS IST FEHLGESCHLAGEN	MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG

	Mutation befindet sich an ungewöhnlicher Stelle.	Probe sequenzieren, um Mutation zu bestätigen.

Problem 8 – Kontamination von Proben mit Positive Controls

Verdaumuster stimmen mit Anwesenheit von gemischten gestempelten Regionen der Positive Controls und Wild-Type-Heteroduplices überein.	**MÖGLICHE URSACHE**	**LÖSUNG**
	Schlechte Pipettiertechnik	Beim Pipettieren der Proben besonders darauf achten, dass es nicht zur Kreuzkontamination kommt. Überprüfen Sie die Regionen der Kontrollstempelsequenz auf Kontamination der Positive Control.
Sequenzierung von *NRAS* Exon 2-Stempelregionen zeigt eine Kontamination der Probe. **Region Codon 12 und 13 von *NRAS* Exon 2** **Plasmidkontrolle „Stempel"region von *NRAS* Exon 2**  Probe ist Wild-Type Stempelsequenz ist vorhanden **Kontaminiert** Probe ist Mutant Keine Stempelsequenz **Gültige Probe** Probe ist Wild-Type Keine Stempelsequenz vorhanden **Gültige Probe**	Schlechte Pipettiertechnik	Beim Pipettieren der Proben besonders darauf achten, dass es nicht zur Kreuzkontamination kommt. Überprüfen Sie die Regionen der Kontrollstempelsequenz auf Kontamination der Positive Control.

Einzelheiten zur Bestellung

Produkt-nummer	Produktname	Größe
710104	SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD	100 Reaktionen
710106	SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exons 3 & 4 CE IVD	100 Reaktionen
710400	SURVEYOR Scan *NRAS* Kit Exons 2, 3 & 4 CE IVD	100 Reaktionen
710077	CRC *RAS*can Combination Kit	230 Reaktionen

Kontaktdaten

Hauptniederlassung
Transgenomic, Inc.
12325 Emmet Street
Omaha
Nebraska 68164
United States of America

Tel.: (888) 233-9283* oder +1 (402) 452-5400
Fax: +1 (402) 452-5401
E-Mail: support@transgenomic.com

*Nur in Nordamerika

Europa
Transgenomic Limited
40 Watt Road
Hillington Park, Hillington
Glasgow G52 4RY
United Kingdom

Tel.: +44 141 892 8800
Fax: +44 141 883 5967
E-Mail: support@transgenomic.com

www.Transgenomic.com

Transgenomic®
Advancing Personalized Medicine

Übersetzungseinschränkung

Transgenomic, Inc. hat alle Anstrengungen unternommen, um die Genauigkeit dieser Übersetzung zu gewährleisten. Wenn Sie Fragen zu Angaben in dieser übersetzten Version des Handbuchs haben oder zu der englischen Version ***Instructions for Use for the CRC RAScanTM Combination Kit for DHPLC Systems*** – 482427(EN) unter http://world.Transgenomic.com/files/literature/482427(EN).pdf bitten wir Sie Kontakt mit Transgenomic unter support@transgenomic.com. Aufzunehmen.

Lizenzen, Handelsmarken & Copyright

SURVEYOR Nuclease: Dieses Produkt wurde unter exklusiver Lizenz der US-Patente 6,699,980; 6,391,557; 5,869,245, ihrer ausländischen Entsprechungen und weiterer anhängiger Patente hergestellt. Für die Verwendung von SURVEYOR Nuclease ist eine Lizenz von Transgenomic erforderlich. Akademische, Non-Profit und For-Profit-Organisationen besitzen mit Kauf dieses Produkts eingeschränkte Rechte, die SURVEYOR Nuclease zu Forschungszwecken zu nutzen. Ein Weiterverkauf bzw. eine anderweitige Verwendung sind streng verboten. Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an Transgenomic.

DNA Polymerase: Die Verwendung dieses Produkts ist durch eine oder mehrere der folgenden US-Patente sowie zugehörige Patentansprüche außerhalb der USA geschützt: 5,789,224; 5,618,711; 6,127,155 sowie Ansprüche außerhalb der USA zugehörig zu US-Patent Nr. 4,889,818. Der Kauf dieses Produkts schließt ein eingeschränktes, nicht übertragbares Nutzungsrecht dieses Produkts für eigene Forschungszweck des Käufers ein. Es wird damit kein Recht unter einem anderen Patentanspruch (wie die patentierten 5'Nuclease-Verfahrensansprüche unter US-Patent-Nummern 5,210,015 und 5,487,972), kein Recht zur Durchführung einer patentierten Methode sowie kein Recht zur Durchführung jedweder kommerzieller Dienstleistungen, insbesondere die Übermittlung von Ergebnisse der Tätigkeiten von Erwerbern gegen ein Honorar oder andere wirtschaftliche Gegenwerte, weder ausdrücklich noch implizit bzw. durch Rechtsverwirkung abgetreten. Dieses Produkt dient ausschließlich Forschungszwecken. Für die diagnostische Verwendung unter Roche - Patenten ist eine separate Lizenz von Roche erforderlich. Für weitere Informationen über den Erwerb von Lizenzen wenden Sie sich an den Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA..

Transgenomic, SURVEYOR und WAVE sind eingetragene Marken, und Navigator, CRC *RAS*can, das Helix-Logo und Advancing Personalized Medicine sind Marken von Transgenomic, Inc. Alle anderen Marken sind das Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

© 2013 Transgenomic, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Gedruckt in den USA.

Dokument Nr. 482427(DE) rev-01